

09/674337
PCT/JP99/02305

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 25 JUN 1999
WIPO EAJU
30.04.99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1998年 4月30日

REC'D 25 JUN 1999

WIPO PCT

出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第137685号

出 願 人
Applicant(s):

科学技術振興事業団

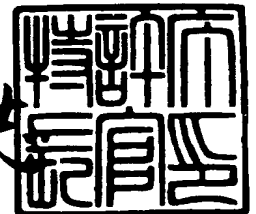
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 6月11日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

山 佐 健 志



出証番号 出証特平11-3037219

【書類名】 特許願

【整理番号】 PA906235

【提出日】 平成10年 4月30日

【あて先】 特許庁長官 荒井 寿光 殿

【国際特許分類】 C12N
C07K

【発明の名称】 ニコチアナミン合成酵素、それをコードする遺伝子

【請求項の数】 24

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区弥生1-1 東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 植物分子生理学研究室内

【氏名】 森 敏

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区弥生1-1 東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 植物分子生理学研究室内

【氏名】 樋口 恭子

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区弥生1-1 東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 植物分子生理学研究室内

【氏名】 鈴木 一矢

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区弥生1-1 東京大学大学院 農学生命科学研究科 農学国際専攻 新機能植物開発学研究室内

【氏名】 西澤 直子

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区弥生1-1 東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 植物分子生理学研究室内

【氏名】 中西 啓仁

【特許出願人】

【識別番号】 396020800
 【氏名又は名称】 科学技術振興事業団
 【代表者】 理事長 中村 守孝

【代理人】

【識別番号】 100102668
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 佐伯 憲生
 【電話番号】 03-5688-5136

【手数料の表示】

【納付方法】 予納
 【予納台帳番号】 039251
 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【物件名】 委任状 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ニコチアナミン合成酵素、それをコードする遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列表の配列番号 1 に示されるアミノ酸配列、又は、その一部のアミノ酸が欠失、他のアミノ酸で置換、若しくは他のアミノ酸が付加されてなるアミノ酸配列を有するニコチアナミン合成酵素。

【請求項 2】 オオムギ由来のものである請求項 1 に記載のニコチアナミン合成酵素。

【請求項 3】 配列表の配列番号 1、3、5、7、9、11 又は 13 に示されるアミノ酸配列を有する請求項 1 又は 2 に記載のニコチアナミン合成酵素。

【請求項 4】 アラビドプシス由来のものである請求項 1 に記載のニコチアナミン合成酵素。

【請求項 5】 配列表の配列番号 15、17 又は 19 に示されるアミノ酸配列を有する請求項 1 又は 4 に記載のニコチアナミン合成酵素。

【請求項 6】 請求項 1 から 5 のいずれかに記載されるニコチアナミン合成酵素のアミノ酸配列をコードする遺伝子。

【請求項 7】 遺伝子が cDNA である請求項 6 に記載の遺伝子。

【請求項 8】 配列表の配列番号 2、4、6、8、10、12 又は 14 に示される塩基配列を有する請求項 6 又は 7 に記載の遺伝子。

【請求項 9】 配列表の配列番号 16、18 又は 20 に示される塩基配列を有する請求項 6 又は 7 に記載の遺伝子。

【請求項 10】 請求項 6 から 9 のいずれかに記載の遺伝子を含有してなるベクター。

【請求項 11】 ベクターが発現ベクターである請求項 10 に記載のベクター。

【請求項 12】 請求項 10 又は 11 に記載されたベクターで形質転換された形質転換体。

【請求項 13】 外来遺伝子が、配列表の配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18 又は 20 に示される塩基配列を有する遺伝子である請求

項 12 に記載の形質転換体。

【請求項 14】 宿主が細菌類である請求項 12 又は 13 に記載の形質転換体。

【請求項 15】 宿主が高等植物細胞である請求項 12 又は 13 に記載の形質転換体。

【請求項 16】 請求項 12 から 15 のいずれかに記載された形質転換体を用いてニコチアナミンを製造する方法。

【請求項 17】 請求項 6 から 9 のいずれかに記載の遺伝子が導入された植物。

【請求項 18】 種子である請求項 17 に記載の植物。

【請求項 19】 請求項 17 又は 18 に記載の植物を生育して得られた果実。

【請求項 20】 請求項 1 から 5 のいずれかに記載のニコチアナミン合成酵素に対する抗体。

【請求項 21】 ポリクローナル抗体である請求項 20 に記載の抗体。

【請求項 22】 モノクローナル抗体である請求項 20 に記載の抗体。

【請求項 23】 植物からニコチアナミン合成酵素を抽出する際に、チオールプロテアーゼ阻害剤の存在下に行うことを特徴とするニコチアナミン合成酵素を抽出する方法。

【請求項 24】 チオールプロテアーゼ阻害剤が E-64 である請求項 23 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

【0002】

本発明は、ムギネ酸の生合成経路におけるニコチアナミン合成酵素、それをコードする遺伝子、当該遺伝子を含有するベクター、当該ベクターで形質転換された細胞、それを用いたニコチアナミンの製造方法、ニコチアナミン合成酵素をコードする遺伝子で形質転換された植物、及び、ニコチアナミン合成酵素に対する

抗体に関する。

【従来の技術】

【0003】

ムギネ酸(mugineic acid)を用いて土中の不溶態Fe (III) をキレート化して吸収するいわゆるストラテジーII ('Strategy-II') によって鉄を吸収するイネ科植物は、鉄のキレーター (ファイトシデロフォア) を根から分泌し、根圏の鉄を可溶化して吸収する(Roemheld, 1987)。その分泌量は鉄欠乏ストレスにより顕著に増加する。ムギネ酸類は現在までに知られている唯一のファイトシデロフォアである (Takagi 1976)。したがって、イネ科植物の鉄欠乏耐性能はムギネ酸類の分泌量に依存すると考えられている (Takagi et al. 1984, Roemheld and Marschner 1986, Marschner et al. 1987, Mori et al. 1987, Kawai et al. 1988, Mori et al. 1988, Mihashi and Mori 1989, Singh et al. 1993)。

【0004】

植物中でのムギネ酸類の生合成経路を図1に示す。まず、S-アデノシルメチオニン合成酵素によりメチオニンからS-アデノシルメチオニンがつくられる。次いで、ニコチアナミン合成酵素により3分子のS-アデノシルメチオニンが結合して1分子のニコチアナミンが生成される。生成したニコチアナミンは、ニコチアナミンアミノ基転移酵素により3'-ケト体になり、続いてなんらかの還元酵素により2'-デオキシムギネ酸になる。これがさらに水酸化されてムギネ酸をはじめとする他のムギネ酸誘導体になる (Mori and Nishizawa 1987, Shojima et al. 1989, Shojima et al. 1990, Ma and Nomoto 1993)。

図1における右下の化合物の R_1 及び R_2 が水素原子で R_3 が水酸基である化合物がムギネ酸である。 R_1 が水素原子で、 R_2 及び R_3 が水酸基である化合物が、3-ヒドロキシムギネ酸である。また、 R_2 が水素原子で R_1 及び R_3 が水酸基である化合物が3-エピヒドロキシムギネ酸である。

【0005】

オオムギの根から3種のS-アデノシルメチオニン合成酵素遺伝子が単離されたが、この発現は鉄欠乏で誘導されなかった (Takizawa et al. 1996)。また、オオムギからディファレンシャルスクリーニング法により得られた遺伝子 Ids3

はデオキシムギネ酸を水酸化してムギネ酸にする酵素の遺伝子であると推定されるが、この発現は鉄欠乏により強く誘導される(Nakanishi et al. 1993)。さらに、ニコチアナミンアミノ基転移酵素が鉄欠乏オオムギの根から精製・単離され、その2つの遺伝子N a a t - AとN a a t - Bが単離された(Takahashi et al. 1997)。このN a a t - Aの発現も、鉄欠乏で誘導された。

【0006】

S-アデノシルメチオニンからニコチアナミンを合成する反応は、脱炭酸S-アデノシルメチオニンからポリアミンを合成する反応と似ている。しかし、ポリアミン合成酵素と違い、ニコチアナミン合成酵素は3分子のS-アデノシルメチオニンの結合とアゼチジン環の形成を同時に触媒するものである(図1)。このようなニコチアナミン合成酵素は新しい型の酵素である。以前われわれは鉄欠乏オオムギ根からのニコチアナミン合成酵素の部分精製と活性の発現パターンについて報告した(Higuchi et al. 1994, Higuchi et al. 1995, Kanazawa et al. 1995, Higuchi et al. 1996a, Higuchi et al. 1996b)。しかし、ニコチアナミン合成酵素は抽出、精製の途中で非常に分解され易く、分離精製することは困難であり、部分アミノ酸配列を決定するのに十分な量を得ることも困難であった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、ニコチアナミン合成酵素を精製単離し、この遺伝子をクローニングし、その塩基配列及びアミノ酸配列を決定し、この遺伝子を用いて鉄欠乏に対する耐性の強い植物、特にイネ科植物を提供することを目的とするものである。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明は、配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するニコチアナミン合成酵素、又は、その一部のアミノ酸が欠失、他のアミノ酸で置換、若しくはさらに他のアミノ酸が付加されてなるアミノ酸配列を有するニコチアナミン合成酵素に関する。

本発明は、前記のニコチアナミン合成酵素のアミノ酸配列をコードする遺伝子に関する。

また、本発明は、前記の遺伝子含有してなるベクター、及び、当該ベクターで形質転換された形質転換体に関する。

【0009】

本発明は、前記形質転換体を用いてニコチアナミンを製造する方法に関する。

また、本発明は、前記の遺伝子が導入された植物、特にイネ科植物、及び、これらの植物を生育させて得られる果実に関する。

本発明は、前記のニコチアナミン合成酵素をチオールプロテアーゼ阻害剤、好ましくはE-64の存在下に抽出する方法に関する。

さらに、本発明は、前記のニコチアナミン合成酵素に対する抗体に関する。

【0010】

本発明者らは、以前からニコチアナミン合成酵素の単離を試みてきたが(Higuchi et al. 1994)、本酵素は非常に分解され易く、単離精製が非常に困難であり、部分アミノ酸配列を決定するのに十分な量すら得ることが困難であった。その後、チオールプロテアーゼの阻害剤であるトランス-エポキシサクシニル-ロイシルアミド-(4-グアニジノ)ブタン(trans-epoxysuccinyl-leucylamido-(4-guanidino) butane (以下、E-64と略す)) E-64によって本酵素の分解が強く抑制されることがわかってきた(Higuchi et al. 1996a)。

今回、液体窒素中で細かい粉状になるまで粉碎した根を、0.1 mMのチオールプロテアーゼ阻害剤E-64を含む抽出バッファーと速やかに混合するようにしたところ、ニコチアナミン合成酵素タンパク質を単離することができ、その遺伝子も単離することができた。

【0011】

さらに、本発明の酵素は、SDS-PAGE後にSDSを除くと活性が回復するが、その回復の程度はかなり低く(Higuchi et al. 1994)、SDS-PAGEを行う前にさらに精製度を上げておく必要があった。そこでカラムクロマトグラフィーの方法についても改善が行なわれた。

また、本発明者らは、本発明の酵素は疎水性が比較的高いため、温和な界面活性剤であるCHAPSをバッファーに加えることにより、分離能が上昇することを見出した。陰イオン交換クロマトグラフィー担体を何種類か試したところ、D

EAEセファロースFFとDEAEセファセルがもっとも効果的であった。

TSKゲル・ブチルトヨパール 650Mに加えて、同じく疎水クロマトグラフィ担体であるTSKゲル・エーテルトヨパール 650Mが30~35 kDaの不純物を取り除くために効果的であった。

【0012】

本発明の酵素は、SDS-PAGE後にSDSを除くと活性が回復する30~35 kDaのペプチドであることが報告されているが、活性は30~35 kDaの間の広い分子量の範囲で検出されていた(図3参照)。図3は、酵素活性を有する分画における分取SDS-PAGEの結果を示す。SDS-PAGEは、11%アクリルアミドスラブゲルで行った。ゲルの一部をクマシーブリリアンドブルーで染色し、残りを銅染色し30~35 kDaを7つに切り分けた(短い線で切った場所を表示)。図3の横棒は、各ゲル片から検出された酵素活性を相対表示したものである。

そこで、これらの分子量を有する蛋白質のなかから、ニコチアナミン合成酵素ペプチドを同定するために、鉄欠乏、及び、対照となるオオムギのそれぞれの根から精製したニコチアナミン合成酵素画分に含まれるペプチドをSDS-PAGEを用いて比較した。それぞれのオオムギの根200gから、後述する実施例3に記載の方法に従い本酵素を精製した。

【0013】

対照の酵素活性は鉄欠乏の1/4であった。

本発明の酵素を精製する各段階の活性画分のペプチド組成をSDS-PAGEで比較したものを、図2に示す。図2は、鉄欠乏のオオムギの根200gからの精製過程(図中(-)で示す)と、対照のオオムギの根200gからの精製過程(図中(+)で示す)との比較を示す。SDS-PAGEは、12.5%アクリルアミドスラブゲル(Laemmli, 1970)で行った。ゲルは、クマシーブリリアンドブルーで染色した。図2の(A)は、DEAEセファロースの前の段階のもので、上段は鉄欠乏のオオムギの根からのものを示し、下段は対照の根からのものを示す。各レーンの、レーン1は粗抽出物200 μ gのものを、レーン2はブチルトヨパール650M後のもの100 μ gのものを、レーン3はヒドロキシルア

パタイト後のもの20 μ gのものを、レーン4はブチルトヨパール650M後のもの15 μ gのものを示している。図2の(B)は、DEAEセファロースFF後のもので、各レーン25 μ gのものである。図2の(C)は、エーテルトヨパール650M後のもので、左側は不活性分画を、右側は活性分画を示し、各画分の1/25を泳動させたものである。

【0014】

この結果から、DEAEセファロースの前の段階までは鉄欠乏、および対照とでほとんど違いは見られなかった(図2のA参照)。DEAEセファロース後、30および31 kDaのペプチドが鉄欠乏で誘導されていることがわかった(図2のB参照)。エーテルトヨパール後、31 kDaペプチドは活性画分から除かれた。新たに32および33 kDaのペプチドが鉄欠乏で誘導されていることがわかる(図2のC参照)。32および33 kDaペプチドからは活性が検出されたが、30 kDaペプチドからは検出されなかった(図3参照)。

【0015】

次に、本発明の酵素の分子量をゲルろ過により決定した。

ニコチアナミン合成酵素のゲルろ過により推定された分子量は、40,000~50,000であると報告されている(Higuchi et al. 1994)。しかし、これはSDS-PAGEによる値と一致していなかった。

今回、本発明者らは、バッファーにCHAPSを加えてゲルろ過を行ったところ分離能が上昇し、本酵素の分子量は35,000と推定された(図4参照)。これは、以前にSDS-PAGEにより推定された値とよく一致した。

【0016】

図4は、ゲルろ過カラムからのニコチアナミン合成酵素活性の溶出パターンを示す。黒丸は酵素活性を示し、実線は280 nmの吸光度を示す。ヒドロキシルアパタイト後の活性画分を、展開バッファー(50 mM Tris、1 mM EDTA、0.1 M KCl、0.05% CHAPS、0.1 mM p-APMSF、3 mM DTT、pH 8.0)で平衡化したセファクリルS300HR(ファルマシア社)カラム(1.5 cm x 71 cm, 125 ml)に通した。分子量マーカーは、チログロブリン(M_r 670,000)、 γ -グロブリ

ン (Mr 158,000)、オブアルブミン (Mr 44,000)、ミオグロビン (Mr 17,000) を用いた。線流速 10 cm/hr で展開した。

【0017】

精製したニコチアナミン合成酵素から部分アミノ酸配列を決定した。

1 kg の鉄欠乏オオムギの根より、後述する実施例 3 の方法を用いて、前述した 30 kDa、32 kDa、および 33 kDa のペプチドを精製した。これらを後述する実施例 4 の方法を用い部分分解した。32 と 33 kDa のペプチドは完全には分離できなかったが、配列は互いによく似ているかあるいは 32 kDa は 33 kDa の分解物であると仮定して一緒に分解した。

決定した部分配列からこれらのペプチドは互いによく似ていることがわかった (図 5)。また、33、32 kDa (1) 断片は分解前の分子量とほとんど変わらない分子量であったのでこの配列が本酵素の N 末端領域であると思われた。コンピューター検索によりこれらの配列とよく似た配列を持つ機能未知の遺伝子がイネ、およびシロイヌナズナにあることがわかった。特にイネの EST-cDNA クローン D23792 と D24790 は、前者については 33 アミノ酸残基の重なるのうち 80.0% が同一のアミノ酸、後者については 19 アミノ酸残基の重なるのうち 68.4% が同一のアミノ酸で非常によく似ていた (図 5)。

図 5 は、オオムギ由来のニコチアナミン合成酵素から決定した 6 つの部分アミノ酸配列と、コンピューター検索により得られたイネの類似の配列とを比較したものである。一致するアミノ酸残基を「:」で示した。PCR に使用したプライマーの配列は矢印で示した部分の塩基配列を利用した。

【0018】

次いで、ニコチアナミン合成酵素 cDNA のクローニングとその塩基配列を決定した。

前述した方法で得られた部分アミノ酸配列からデジェネレートプライマーを合成し、鉄欠乏オオムギ根由来の cDNA に対して PCR を行ったが、目的の DNA は増幅されてこなかった。そこでイネの D23792 と D24790 の配列から、単一の塩基配列を持つプライマー (図 5 中に矢印で表示) を合成して PCR を行った。NF および NR プライマーを用いた PCR で 205 bp の断片が、I

FおよびIRプライマーを用いたPCRで274bpの断片が増幅され、これらは目的の配列を含んでいた。205bpの断片をプローブとして、鉄欠乏オオムギ根ポリ(A)⁺RNA由来のcDNAライブラリーをスクリーニングしたところ19個のクローンが、274bpの断片をプローブとしてスクリーニングしたところ88個のクローンが得られた。

【0019】

得られたクローンのうちNAS1と名付けたものは、985bpの翻訳領域を含みそこから推定されるアミノ酸配列は328アミノ酸残基で、推定分子量35,144であった。この値はSDS-PAGEやゲルろ過から推定された値とよく一致した。32および33kDaペプチドから決定された部分アミノ酸配列は全てNAS1中に含まれていた(図6)。

図6は、NAS1のcDNAの全長とそこから予想されるアミノ酸配列を示したものである。下線で示した部分は、前記図5の部分配列と一致している部分を示している。その右側に塩基の数を示した。左側にアミノ酸残基の数を示した。

予想されるpIは、5.2で未変性等電点電気泳動による値と一致した。NAS1の他に極めてよく似た配列を持つ6個のクローンNAS2、NAS3、NAS4、NAS5-1、NAS5-2、NAS6が得られた(表1、図7)。

図7は、オオムギから得られた前記の7つのcDNAから予想されるアミノ酸配列の比較を示したものである。全てのクローンで一致するアミノ酸残基を「*」で示した。カッコ内の「*」印はNAS5-1及び5-2以外のクローンで一致するアミノ酸残基を示す。下線で示した部分は前記図5の部分配列と一致した部分を示している。

これらのクローンの塩基配列を配列番号2(NAS1)、配列番号4(NAS2)、配列番号6(NAS3)、配列番号8(NAS4)、配列番号10(NAS5-1)、配列番号12(NAS5-2)、配列番号14(NAS6)にそれぞれ示す。また、これらのアミノ酸配列を配列番号1(NAS1)、配列番号3(NAS2)、配列番号5(NAS3)、配列番号7(NAS4)、配列番号9(NAS5-1)、配列番号11(NAS5-2)、配列番号13(NAS6)にそれぞれ示す。

【0020】

【表1】

nasクローンの性質

クローン	アミノ酸 数	分子量	pI	nas1との 相同性(%)	nas2との 相同性(%)	nas4との 相同性(%)
nas1	328	35144	5.20	—		
nas2	336	35839	5.07	72	—	
nas3	336	36013	5.47	72	95	
nas4	330	35396	4.91	73	89	—
nas5-1	268	28802	5.32	57	58	56
nas5-2	283	30148	5.22	61	61	59
nas6	329	35350	5.07	74	89	88

【0021】

30kDaペプチドから決定された部分アミノ酸配列は全てNAS5に含まれていた。これらのクローンの5' および3' 非翻訳領域は互いに似ていなかった。ただしNAS5-1とNAS5-2は、NAS5-2の122～140アミノ酸残基の部分以外は全く同一であった。NAS5-1はNAS5-2の一部が欠損したものと思われるが、これが植物体中で起こったことなのか実験中に起こったことなのかは現在不明である。

イネのニコチアミン合成酵素類似物D23792とD24790は、NAS1と約80%の相同性を示した。シロイヌナズナのAC003114とAB005245はNAS1と約45%の相同性を示した。

アラビドプシス（シロイヌナズナ）のゲノムDNAに対して、図に下線で示し

た配列のプライマーを用いたPCRを行い、シロイヌナズナのコチアナミン合成酵素遺伝子を3つ得た。これをAtNAS-1、AtNAS-2、AtNAS-3とした。

これらの遺伝子の塩基配列を配列番号16 (AtNAS-1)、配列番号18 (AtNAS-2)、配列番号20 (AtNAS-3) にそれぞれ示す。また、これらのアミノ酸配列を配列番号15 (AtNAS-1)、配列番号17 (AtNAS-2)、配列番号19 (AtNAS-3) にそれぞれ示す。

【0022】

得られたNAS1のタンパク質を大腸菌で発現させた。

NAS1のORFをPCRで増幅しベクターpMAL-c2にクローニングして、NAS1がマルトースバインディングプロテインのC末端に融合した形で発現するようにした。融合タンパク質はIPTGにより発現が強く誘導される。

これを用いて形質転換した大腸菌 (*E. coli*) から粗抽出物を得、融合タンパク質の状態でニコチアナミン合成酵素活性を測定したところ、ベクターのみでは全く活性は検出されなかったが、NAS1のORFを導入した場合には活性が検出された。結果を図8に示す。

図8は、マルトースバインディングプロテイン-NAS1融合蛋白質を発現している大腸菌の粗抽出物のニコチアナミン合成活性を、薄層クロマトグラフィー (TLC) で検出した結果を示すものである。図8のレーン1は、標準ニコチアナミド (NA) であり、レーン2はマルトースバインディングプロテイン (SAM) のみを発現している大腸菌のものであり、レーン3はマルトースバインディングプロテイン-NAS1融合蛋白質を発現している大腸菌のものである。

【0023】

後述の実施例7で述べる方法によりノーザンハイブリダイゼーション解析を行ったところ、この遺伝子は鉄欠乏の根で強く誘導されていた (図9)。これは本酵素活性の発現パターンと一致していた (Higuchi et al. 1994)。図9は、NAS1をプローブとしたノーザンハイブリダイゼーション解析の結果を示す。全RNAを、鉄欠乏処理開始後1週間のもの、対照のオオムギの葉と根から抽出し、各レーンに5 μ gのRNAを泳動した。

【0024】

また、後述の実施例 8 で述べる方法によりサザンハイブリダイゼーション解析を行った。B a m H I あるいは E c o R I あるいは H i n d I I I で DNA を断片化したところ複数の断片が検出されたが、現在得られているどのクローンも B a m H I および E c o R I では切断されないで、ニコチアナミン合成酵素遺伝子はオオムギおよびイネのゲノム中で複数コピー存在するものと思われた（図 10）。

図 10 は、N A S 1 をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析の結果を示す。オオムギとイネの葉から抽出したゲノム DNA を B a m H I （レーン B）、E c o R I （レーン R）、H i n d I I I （レーン H）で断片化し、各レーンに 10 μ g を泳動した。

【0025】

さらに、後述する実施例 9 に述べた方法により調製した抗体を用い、実施例 10 で述べる方法によりウエスタンブロット解析を行った。本酵素活性を検出するために調製した粗抽出物中では、本酵素タンパク質は操作中に速やかに分解されることがわかった（図 11）。この染色パターンは本酵素活性が S D S - P A G E 後に 30 ~ 35 k D a の間に広がって検出されること（図 3 参照）と一致した。

図 11 は、活性検出に用いた粗酵素試料のウエスタンブロット解析の結果を示す。S D S - P A G E は、12.5% アクリルアミドスラブゲルで行った。100 μ g のタンパク質を泳動した。

【0026】

後述する実施例 10 に述べる方法によりタンパク質を変性させて得られた粗抽出物中では、35 ~ 36 k D a のほぼ単一のバンドとして検出された（図 12）。この値はアミノ酸配列から予想された値とよく一致した。

図 12 は、トリクロロ酢酸／アセトンで抽出した全タンパク質のウエスタンブロット解析の結果を示す。S D S - P A G E は 12.5% アクリルアミドスラブゲルで行った。100 μ g のタンパク質を泳動した。根については 200 μ g、葉については 500 μ g のタンパク質を泳動した。

2 次元電気泳動を行った後ウエスタンブロット解析を行ったところ数個のスポ

ットが検出された。このことは複数のニコチアナミン合成酵素遺伝子が得られたことと一致していた。どのスポットも鉄欠乏の根で誘導されていた。

【0027】

ムギネ酸類の分泌量は根乾燥重量 1 g あたり 1 日に 20 mg に達する (Takagi 1993)。われわれが検出した粗精製ニコチアナミン合成酵素活性はこれをまかなうのに足りるものであった。本酵素タンパク質が数種類以上存在していること、および活性のない 30 kDa ペプチドが存在していることから、これらのペプチドが会合することにより、3 分子の S-アデノシルメチオニンを結合するのに適した構造となり最大の活性を示す、ということも考えられる。しかしゲルろ過により推定された分子量は 35,000 であった (図 4)。

また、サブユニットが再会合したことによる活性の上昇は現在までのところ観察されていない。さらにマルトースバインディングプロテインとの融合タンパク質の状態でも活性を示したことから、本発明者らは、今のところ本酵素は単量体であると考えている。しかしながら、多量体を形成してより大きな活性を示すという可能性が完全に否定されているわけではない。

【0028】

S-アデノシルメチオニンからニコチアナミンを合成する反応機構は、S-アデノシルメチオニンをメチル基供与体とするメチル基転移反応や、脱炭酸 S-アデノシルメチオニンからスペルミジンやスペルミンを合成する反応と似ていると思われる。これらの酵素に共通の触媒部位についてはタンパク質の高次構造中での等価なアミノ酸残基の配置の類似性が論じられている (Hashimoto et al. 1998, Schluckebier et al. 1995)。

将来、他の植物種のニコチアナミン合成酵素とのアミノ酸配列の比較や X 線結晶構造解析から触媒部位が明らかになるであろう。

【0029】

鉄欠乏によるニコチアナミン合成酵素活性の誘導はイネ科植物に特有の現象であり、ムギネ酸類の大量生合成のために必須である。イネは主要なイネ科作物の中でムギネ酸類の分泌量がもっとも少なく、石灰質土壌での鉄欠乏に非常に弱い。したがって、本発明のニコチアナミン合成酵素の遺伝子をイネ科植物、特に

イネに導入し、鉄欠乏時に大量に発現させるようにして鉄欠乏耐性のある形質転換イネを作出することにより、石灰質土壌でのイネの栽培が可能となる。

イネ科植物においてはこれまで、ニコチアナミンはムギネ酸類を合成する前駆体としての役割しか考えられていなかったが、本発明によりニコチアナミン合成酵素の遺伝子は多重遺伝子族を形成していることが明らかになったことから、イネ科植物においても他に重要な役割をはたしていることが考えられる。

【0030】

イネ科以外のムギネ酸類を分泌しない植物では、ニコチアナミンは体内で、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} といった2価金属陽イオンのキレーターとして働き、これらの金属の恒常性の維持に貢献するのではないかとされており (Stephan et al. 1994)、イネ科植物でも同様の役割をはたしていることが考えられる。

また、ニコチアナミン合成酵素活性は双子葉植物では、鉄欠乏により誘導されず、本発明の遺伝子の発現も鉄欠乏で誘導されないものと思われる。本発明者らは、シロイヌナズナのニコチアナミン合成酵素遺伝子をクローン化している。これらの遺伝子のプロモーター領域を比較することにより鉄欠乏による遺伝子発現の機構が明らかにされることにより、本発明の遺伝子がイネ科植物のみならず、双子葉植物においても重要な機能を果たすことになるであろう。

【0031】

配列表の配列番号1に本発明のニコチアナミン合成酵素のアミノ酸配列を示す。

本発明のニコチアナミン合成酵素は、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するもののみならず、ニコチアナミン合成酵素の活性を失わない限り、これらのアミノ酸配列の一部、好ましくは全アミノ酸の50%以下、より好ましくは30%以下、さらに好ましくは10%以下のアミノ酸が欠失してもよいし、他のアミノ酸で置換されていてもよいし、若しくは、他のアミノ酸が更に付加していてもよいし、又は、これらの欠失、置換、付加が組み合わされていてもよい。

【0032】

また、配列表の配列番号2に本発明のニコチアナミン合成酵素をコードする塩

基配列を示す。

本発明のニコチアナミン合成酵素をコードする遺伝子は、配列番号 2 に示される塩基配列を有するもののみならず、前記したニコチアナミン合成酵素をコードする遺伝子を包含するものである。

【0033】

本発明の前記遺伝子を導入するベクターとしては、特に制限はないが、種々のベクターに導入することが可能である。好ましいベクターとしては発現ベクターが挙げられる。

本発明の組換えベクターを用いて種々の細胞を常法に従って形質転換することができる。得られた形質転換体を用いてニコチアナミドを大量に製造することができる。これらの方法は当業者によく知られている方法により行うことができる。

【0034】

本発明の前記遺伝子を導入する宿主としては、各種の細菌類、酵母、細胞類などが挙げられる。好ましくは、植物が挙げられ、特にイネ科植物が好ましい。

遺伝子を導入する方法としては、特に制限はなく、ベクターを使用してもよいし、ゲノムに直接導入してもよい。

【0035】

本発明のニコチアナミン合成酵素に対する抗体は、常法により本発明のニコチアナミン合成酵素を用いて製造することができる。抗体はポリクローナル抗体であってもよく、必要ならば、モノクローナル抗体とすることもできる。

【0036】

さらに、本発明の遺伝子を用いて、植物、好ましくはイネ科植物の品種の改良を行うこともできる。特に、鉄分が欠乏している土壌においても生育できる品種に改良するために、本発明の遺伝子を利用することができる。

【0037】

【実施例】

以下に本発明をより具体的に説明するために実施例を示すが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0038】

実施例 1 (植物材料の調製)

オオムギ(*Hordeum vulgare* L. cv エヒメハダカ 1 号) を湿らせた濾紙の上で発芽させてから標準的な水耕液 (Mori and Nishizawa 1987) を用いて自然光のもと、空調設備のない温室で育成させた。水耕液の pH は、0.5 N HCl を用いて毎日 5.5 に合わせた。第 3 葉が展開したとき鉄を除いた水耕液に移した。水耕液の pH は、0.5 N NaOH を用いて毎日 7.0 に合わせた。対照区は引き続き標準的な水耕液で育成させた。水耕液は 1 週間に 1 回更新した。鉄欠乏処理開始後 2 週間以降に第 4、5 葉に顕著に鉄欠乏クロロシス症状が現れたところで根を採取し、液体窒素で瞬間的に凍結させ、 -80°C で使用時まで保管した。

【0039】

実施例 2 (ニコチアナミン合成酵素活性の測定)

すでにわれわれが発表した測定方法 (Higuchi et al. 1996a) を改善した方法を用いた。酵素液を反応バッファー (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 3 mM ジチオスレイトール (dithiothreitol) (以下、DTT と略す)、 $10\text{ }\mu\text{M}$ (P-アミジノフェニル) メタンスルホニルフルオライド ((p-amidinophenyl) methanesulfonyl fluoride) (以下、p-APMSF と略す)、 $10\text{ }\mu\text{M}$ トランス-エポキシサクシニル-ロイシルアミド- (4-グアニジノ) ブタン (trans-epoxysuccinyl-leucylamido-(4-guanidino) butane) (以下、E-64 と略す)、pH 8.7) でバッファー交換した。バッファー交換には限外ろ過フィルターユニット、ウルトラフリー C3 LGC NMWL 10000 (ミリポア社) を用いた。カルボキシル基が ^{14}C で放射能標識された S-アデノシルメチオニン (アマシャム社) を、終濃度 $20\text{ }\mu\text{M}$ となるように添加し、15 分間 25°C に保った。反応生成物をシリカゲル LK6 (ワットマン社) を用い展開溶媒 (フェノール : n-ブタノール : ギ酸 : 水 = 12 : 3 : 2 : 3) で薄層クロマトグラフィーにて分離した。反応生成物の放射活性はイメージアナライザー BAS-2000 (フジフィルム社) で検出した。タンパク質量はブラッドフォード法によるプロテインアッセイキット (バイオラッド社) を用いて測定した。

【0040】

実施例3 (ニコチアナミン合成酵素の精製)

以下の操作はすべて4℃で行い、ニコチアナミン合成酵素を含む画分には終濃度10 μ MとなるようにE-64を添加した。

凍結した根を液体窒素中で粉状になるまで粉碎し、根100gあたり200mlの抽出バッファー(0.2M Tris, 10mM EDTA, 5%(v/v)グリセリン(glycerol), 10mM DTT, 0.1mM E-64, 0.1mM p-APMSF, 5%(w/v)不溶性ポリビニルピロリドン(polyvinylpyrrolidone)(PVP), pH8.0)を加えて家庭用ジューサーミキサーを用いて混合した。これを、22,500 \times g30分間で遠心分離し上清を得た。これに硫酸アンモニウムを終濃度0.4Mとなるように加え、1時間静置した。再度22,500 \times g30分間で遠心分離し上清を得た。

【0041】

TSKゲル・ブチルトヨパール650Mカラム(東ソー社、根100gあたりカラム体積10ml)を吸着バッファー(20mM Tris, 1mM EDTA, 3mM DTT, 0.4M (NH₄)₂SO₄, 0.1mM p-APMSF, pH8.0)で平衡化したものに遠心分離上清を通しニコチアナミン合成酵素を吸着させ、溶出バッファー(10mM Tris, 1mM EDTA, 3mM DTT, 0.1mM p-APMSF, 5%グリセリン(glycerol), 0.05%3-[(3-クロラミドプロピル)ジメチルーアンモニオ]プロパンスルホン酸(3-[(3-cholamidopropyl) dimethyl-ammonio] propanesulfonic acid)(以下、CHAPSと略す), pH8.0)で溶出した。

【0042】

このニコチアナミン合成酵素を含む溶出画分に、塩化カリウムを終濃度10mMとなるように、1Mリン酸カリウムバッファー(pH8)を終濃度1mMとなるように加えた。吸着バッファー(1mM K-P, 10mM KCl, 3mM DTT, 0.1mM p-APMSF, pH8.0)で平衡化したヒドロキシルアパタイト100~350メッシュ(ナカライ社)をタンパク質100mgあたり10ml用意し、これにニコチアナミン合成酵素を含む画分を通した。ニコ

チアナミン合成酵素は吸着されずにそのまま出てきた。

この素通り画分をすでに述べたようにTSKゲル・ブチルトヨパール650Mカラム(タンパク質10mgあたりカラム体積1ml)に吸着させ、ニコチアナミン合成酵素を溶出した。

吸着バッファー(20mM Tris, 1mM EDTA, 3mM DTT, 0.1mM p-APMSF, 0.05% CHAPS, pH 8.0)で平衡化したDEAEセファロースFFカラム(ファルマシア社、タンパク質25mgあたりカラム体積5ml)にこのニコチアナミン合成酵素を含む溶出画分を通し、塩化カリウム濃度0.05M, 0.1M, 0.15M, 0.2Mで段階溶出した。ニコチアナミン合成酵素は0.15Mで溶出された。

【0043】

TSK ゲル・エーテルトヨパール650Mカラム(東ソー社、根100gあたりカラム体積10ml)を吸着バッファー(20mM Tris, 1mM EDTA, 3mM DTT, 1.2M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1mM p-APMSF, pH 8.0)で平衡化したものにこのニコチアナミン合成酵素を含む溶出画分を通した。ニコチアナミン合成酵素は吸着されずにそのまま出てきた。これをそのまますでに述べたようにTSKゲル・ブチルトヨパール650Mカラムに吸着させ、ニコチアナミン合成酵素を溶出した。

以上のカラムクロマトグラフィーにより精製されたニコチアナミン合成酵素を含む画分中のペプチドをさらに、11%アクリルアミドゲルを用いてドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(以下SDS-PAGEと略す)により分離した。SDS-PAGE終了後、ゲルを0.3M 塩化銅で染色し(Dzandu et al. 1988)分離したペプチドのバンドを切りだした。このゲル片を0.25M EDTA/0.25M Tris (pH 9.0)で脱色し、抽出バッファー(1% SDS, 25mM Tris, 192mM グリシン(glycine))と共にすりつぶした。これをSDSを含まないバッファー(25mM Tris, 192mM グリシン(glycine))を用いて電気抽出し、ペプチドを回収した。

【0044】

実施例4 (部分アミノ酸配列の決定)

単離したニコチアナミン合成酵素を、臭化シアンを用いて化学分解した (Gross 1967)。

SDS-PAGE終了後、ニコチアナミン合成酵素を含むゲル片に10倍体積の70% (v/v) ぎ酸、1% (w/v) 臭化シアンを加え4℃で1晩かけて分解した。分解終了後、液体部分を回収し、減圧乾固した。これをSDS-PAGE用試料バッファーに溶かし、1晩室温においた後、トリシンを含む16.5% アクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGE (Schagger and Jagow, 1987)で、分解産物を分離した。泳動終了後PVDF膜にペプチドを転写し (Towbin et al., 1979) アミドブラックで染色した。染色されたバンドを切り分け、エドマン分解気相シーケンサー (モデル492Aプロテインシーケンサー, アプライドバイオシステムズ社) により、各ペプチドのN末端側からアミノ酸配列を決定した。

【0045】

実施例5 (ニコチアナミン合成酵素遺伝子のクローニング)

得られた部分アミノ酸配列に基づいて合成したプライマーを用い、鉄欠乏オオムギ根由来のcDNAに対してPCRを行った。得られたDNA断片をランダムプライマーキット (宝酒造) により [α -³²P] dATPで放射能標識したものをプローブとして、鉄欠乏オオムギ根ポリ (A)⁺RNAから調整したpYH23 cDNAライブラリーをスクリーニングした。単離したcDNAクローンについてサイクルシーケンシングキット (島津分光) および島津DNAシーケンサーDSQ-1000Lを用いて塩基配列を決定した。

シロイヌナズナのAC003114とAB005245の塩基配列に基づいて合成したプライマーを用い、シロイヌナズナのゲノムDNAに対してPCRを行った。得られたDNA断片についてサイクルシーケンシングキット (島津分光) および島津DNAシーケンサーDSQ-1000Lを用いて塩基配列を決定した。

決定された塩基配列を配列表の配列番号2に示す。

【0046】

実施例6 (NAS1タンパク質の大腸菌での発現)

PCRにより、NAS1 cDNAの最初のATGの上流にEcoRIサイトを、終止コドンの下流にPstIおよびBamHIサイトを導入した断片を増幅した。まず得られた増幅産物をEcoRIサイトとBamHIサイトを用いてpBluescript II SK-にサブクローニングし、塩基配列が正しいことを確認した。次にEcoRIサイトとPstIサイトを用いてpMAL-c2にクローニングし、NAS1がマルトースバインディングプロテインのC末端に融合した形で発現するようにした。

【0047】

この融合タンパク質を発現させる宿主として大腸菌(E.coli strain XL1-Blue)を用いた。pMAL-c2-NAS1とpMAL-c2をそれぞれXL1-Blueに導入しアンピシリンとテトラサイクリンをそれぞれ50 μ g/ml含むLB培地でOD600が0.5になるまで37℃で培養した。イソプロピル β -D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を、終濃度0.3 mMとなるように添加し、引き続き37℃で培養し3時間後に集菌した。菌体を0.2 M NaCl, 1 mM EDTA, 3 mM DTT, 0.1 mM E-64を含む10 mM トリスバッファー pH 7.4 に懸濁し液体窒素で凍結した。これを氷水中で融解し15秒間の超音波処理を10回行った。得られた粗抽出物のニコチアミン合成酵素活性を実施例2で述べた方法で測定した結果、酵素活性が確認された。

【0048】

実施例7 (ノーザンハイブリダイゼーション)

NAS1 cDNAを、HindIIIとNotIで切断したDNA断片を[α -³²P] dATPで放射能標識したものをプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行った。オオムギから全RNAを抽出し(Naito et al. 1988)、1.4% アガロースゲル電気泳動により分離した後、ハイボンド-N⁺膜(アマシャム社)に転写した。膜を0.5 M チャーチリン酸(Church and Gilbert 1984), 1 mM EDTA, 7% (w/v) SDS, 100 μ g/ml サケ精巢DNAを含むバッファーを用いて65℃1晩でプローブとハイブリダイズした。こ

れを40 mMチャーチリン酸, 1% (w/v) SDSを含むバッファーを用いて65℃10分間洗浄した。この洗浄をもう1回行った後、0.2% (w/v) SDSを含むバッファーを用いて65℃10分間洗浄した。放射活性はイメージアナライザーBAS-2000で検出した。

結果を図9に示す。

【0049】

実施例8 (サザンハイブリダイゼーション)

オオムギとイネの葉からそれぞれゲノムDNAを抽出した。これをBamHI、あるいはEcoRI、あるいはHindIIIで断片化し、0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動で分離した後、ハイボンド-N⁺膜 (アマシャム社) に転写した。実施例7で述べた方法でハイブリダイズし、放射活性を検出した。

結果を図10に示す。

【0050】

実施例9 (ポリクローナル抗体の調製)

ネズミ2匹を約100 μgの単離したニコチアナミン合成酵素を抗原として免疫した。抗原としては部分アミノ酸配列を決定したものと同一試料を用いた。1回目の免疫時には完全フロイントアジュバント、2回目以降は不完全フロイントアジュバントを用いた。4回免疫した後、全採血を行い、血清を-80℃で保存した。

【0051】

実施例10 (ウェスタンブロット解析)

トリクロロ酢酸とアセトンを用いて全タンパク質を抽出した (Damerval et al. 1986)。植物体を液体窒素中で粉状になるまで粉碎し、10% (w/v) トリクロロ酢酸、0.1% (v/v) 2-メルカプトエタノール (2-mercaptoethanol) を含むアセトンと混合した。-20℃で1時間静置してタンパク質を沈殿させた後、16,000 × g 30分遠心して沈殿を回収した。沈殿を0.1% (v/v) 2-メルカプトエタノール (2-mercaptoethanol) を含むアセトンに懸濁し、-20℃で1時間静置してタンパク質を沈殿させた後、16,000 × g 30分遠心して沈殿を回収した。沈殿を減圧乾燥した後、試料バッファー (9.5

M尿素(urea), 2% (w/v) トリトン-X-100 (Triton X-100), 5% (v/v) 2-ME) に溶かし、16,000 × g 10分遠心して上清を得た。これに含まれるタンパク質をSDS-PAGE、あるいは変性2次元電気泳動(0' Farrell 1975)で分離した後、PVDF膜に転写した。この膜に対して、実施例9で調製した抗ニコチアナミン合成酵素抗体を1次抗体、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗マウスIgG (H+L) ヤギ抗体 (和光純薬) を2次抗体として、ジアミノベンジジンで発色しウエスタンブロット解析を行った。

結果を図12に示す。SDS-PAGEは12.5%アクリルアミドスラブゲルで行った。100 μgのタンパク質を泳動した。根については200 μg、葉については500 μgのタンパク質を泳動した。

【0052】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：328

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：オオムギ

配列

Met Asp Ala Gln Asn Lys Glu Val Ala Ala Leu Ile Glu Lys Ile	15
Ala Gly Ile Gln Ala Ala Ile Ala Glu Leu Pro Ser Leu Ser Pro	30
Ser Pro Glu Val Asp Arg Leu Phe Thr Asp Leu Val Thr Ala Cys	45
Val Pro Pro Ser Pro Val Asp Val Thr Lys Leu Ser Pro Glu His	60
Gln Arg Met Arg Glu Ala Leu Ile Arg Leu Cys Ser Ala Ala Glu	75
Gly Lys Leu Glu Ala His Tyr Ala Asp Leu Leu Ala Thr Phe Asp	90
Asn Pro Leu Asp His Leu Gly Leu Phe Pro Tyr Tyr Ser Asn Tyr	105
Val Asn Leu Ser Arg Leu Glu Tyr Glu Leu Leu Ala Arg His Val	120
Pro Gly Ile Ala Pro Ala Arg Val Ala Phe Val Gly Ser Gly Pro	135

Leu Pro Phe Ser Ser Leu Val Leu Ala Ala His His Leu Pro Glu	150
Thr Gln Phe Asp Asn Tyr Asp Leu Cys Gly Ala Ala Asn Glu Arg	165
Ala Arg Lys Leu Phe Gly Ala Thr Ala Asp Gly Val Gly Ala Arg	180
Met Ser Phe His Thr Ala Asp Val Ala Asp Leu Thr Gln Glu Leu	195
Gly Ala Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met Ala	210
Ala Glu Glu Lys Ala Lys Val Ile Ala His Leu Gly Ala His Met	225
Val Glu Gly Ala Ser Leu Val Val Arg Ser Ala Arg Pro Arg Gly	240
Phe Leu Tyr Pro Ile Val Asp Pro Glu Asp Ile Arg Arg Gly Gly	255
Phe Glu Val Leu Ala Val His His Pro Glu Gly Glu Val Ile Asn	270
Ser Val Ile Val Ala Arg Lys Ala Val Glu Ala Gln Leu Ser Gly	285
Pro Gln Asn Gly Asp Ala His Ala Arg Gly Ala Val Pro Leu Val	300
Ser Pro Pro Cys Asn Phe Ser Thr Lys Met Glu Ala Ser Ala Leu	315
Glu Lys Ser Glu Glu Leu Thr Ala Lys Glu Leu Ala Phe	328

配列番号：2

配列の長さ：1295

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

起源

生物名：オオムギ

配列

10	20	30	40	50	60
GCGTTCAGAG GCTTCCAGAG TTCTCCGGT CACCAAGAAG CATTTGATCA TAACATGGAT					
70	80	90	100	110	120
GCCCAGAACA AGGAGGTCGC TGCTCTGATC GAGAAGATCG CCGGTATCCA GGCCGCCATC					

130	140	150	160	170	180
GCCGAGCTGC CGTCGCTGAG CCCGTCCCC GAGGTCGACA GGCTCTTCAC CGACCTCGTC					
190	200	210	220	230	240
ACGGCCTGCG TCCCGCCGAG CCCCCTCGAC GTGACGAAGC TCAGCCCGGA GCACCAGAGG					
250	260	270	280	290	300
ATGCGGGAGG CTCTCATCCG CTTGTGCTCC GCCGCCGAGG GGAAGCTCGA GGCGCACTAC					
310	320	330	340	350	360
GCCGACCTGC TCGCCACCTT CGACAACCCG CTCGACCACC TCGGCCTCTT CCCGTACTAC					
370	380	390	400	410	420
AGCAACTACG TCAACCTCAG CAGGCTGGAG TACGAGCTCC TGGCGCGCCA CGTGCCGGGC					
430	440	450	460	470	480
ATCGCGCCGG CGCGCGTCGC CTTGTCGGC TCCGGCCCCG TGCCGTTTAC CTCGCTCGTC					
490	500	510	520	530	540
CTCGCCGCGC ACCACCTGCC CGAGACCCAG TTCGACAACT ACGACCTGTG CGGCGCGGCC					
550	560	570	580	590	600
AACGAGCGCG CCAGGAAGCT GTTCGGCGCG ACGGCGGACG GCGTCGGCGC GCGTATGTGC					
610	620	630	640	650	660
TTCCACACGG CGGACGTCGC CGACCTCACC CAGGAGCTCG GCGCCTACGA CGTGGTCTTC					
670	680	690	700	710	720
CTCGCCGCGC TCGTCGGCAT GGCAGCCGAG GAGAAGGCCA AGGTGATTGC CCACCTGGGC					

730 740 750 760 770 780
GCGCACATGG TGGAGGGGGC GTCCCTGGTC GTGCGGAGCG CACGGCCCCG CGGCTTTCTT

790 800 810 820 830 840
TACCCCATTTG TCGACCCGGA GGACATCAGG CGGGGTGGGT TCGAGGTGCT GGCCGTGCAC

850 860 870 880 890 900
CACCCGGAAG GTGAGGTGAT CAACTCTGTC ATCGTCGCCC GTAAGGCCGT CGAAGCGCAG

910 920 930 940 950 960
CTCAGTGGGC CGCAGAACGG AGACGCGCAC GCACGGGGCG CGGTGCCGTT GGTCAGCCCCG

970 980 990 1000 1010 1020
CCATGCAACT TCTCCACCAA GATGGAGGCG AGCGCGCTTG AGAAGAGCGA GGAGCTGACC

1030 1040 1050 1060 1070 1080
GCCAAAGAGC TGGCCTTTTG ATTGAAGAGT GCGCGTGGTC ATTCTGTCGC CTGCGATCGT

1090 1100 1110 1120 1130 1140
GGTAACTTTC CTACTCGTGT GTGTTTTGAT GTTGTGCCT GTAAGAGTTA TGCTTCCGGC

1150 1160 1170 1180 1190 1200
CTTGTGCTGT TAATTTACAC GCGTTACATG TAGTACTTGT ATTTATACCT GGAATAACGG

1210 1220 1230 1240 1250 1260
TATGTAACAT AAATATTAGT GGGATTTGAA GTGTAATGCT AAATAATAAG AAAACTTGAT

1270 1280 1290 1300 1310 1320

GCAGACATTC AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAA.....

配列番号 : 3

配列の長さ : 335

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

生物名 : オオムギ

配列

Met Ala Ala Gln Asn Asn Gln Glu Val Asp Ala Leu Val Glu Lys	15
Ile Thr Gly Leu His Ala Ala Ile Ala Lys Leu Pro Ser Leu Ser	30
Pro Ser Pro Asp Val Asp Ala Leu Phe Thr Glu Leu Val Thr Ala	45
Cys Val Pro Pro Ser Pro Val Asp Val Thr Lys Leu Gly Pro Glu	60
Ala Gln Glu Met Arg Glu Gly Leu Ile Arg Leu Cys Ser Glu Ala	75
Glu Gly Lys Leu Glu Ala His Tyr Ser Asp Met Leu Ala Ala Phe	90
Asp Lys Pro Leu Asp His Leu Gly Met Phe Pro Tyr Tyr Asn Asn	105
Tyr Ile Asn Leu Ser Lys Leu Glu Tyr Glu Leu Leu Ala Arg Tyr	120
Val Pro Gly Gly Tyr Arg Pro Ala Arg Val Ala Phe Ile Gly Ser	135
Gly Pro Leu Pro Phe Ser Ser Phe Val Leu Ala Ala Arg His Leu	150
Pro Asp Thr Met Phe Asp Asn Tyr Asp Leu Cys Gly Ala Ala Asn	165
Asp Arg Ala Ser Lys Leu Phe Arg Ala Asp Arg Asp Val Gly Ala	180
Arg Met Ser Phe His Thr Ala Asp Val Ala Asp Leu Ala Gly Glu	195
Leu Ala Lys Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met	210
Ala Ala Glu Asp Lys Ala Lys Val Ile Ala His Leu Gly Ala His	225
Met Ala Asp Gly Ala Ala Leu Val Val Arg Ser Ala His Gly Ala	240
Arg Gly Phe Leu Tyr Pro Ile Val Asp Pro Gln Asp Ile Gly Arg	255
Gly Gly Phe Glu Val Leu Ala Val Cys His Pro Asp Asp Asp Val	270

Val Asn Ser Val Ile Ile Ala Gln Lys Ser Lys Asp Val His Ala	285
Asp Gly Leu Gly Ser Gly Arg Gly Ala Gly Gly Gln Tyr Ala Arg	300
Gly Thr Val Pro Val Val Ser Pro Pro Cys Arg Phe Gly Glu Met	315
Val Ala Asp Val Thr Gln Asn His Lys Arg Asp Glu Phe Ala Asn	330
Ala Glu Val Ala Phe	335

配列番号：4

配列の長さ：1342

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

起源

生物名：オオムギ

配列

10	20	30	40	50	60
CTCCTGTGCC	TGTCCTGAGG	TACCAAGAAC	ACCACTGAAA	TGGCTGCCCA	GAACAACCAG
70	80	90	100	110	120
GAGGTGGATG	CCCTGGTGGA	GAAGATCACC	GGGCTCCATG	CCGCAATCGC	CAAGCTGCCG
130	140	150	160	170	180
TCGCTCAGCC	CATCCCCGGA	CGTCGACGCG	CTCTTCACGG	AGCTGGTCAC	GGCGTGCGTT
190	200	210	220	230	240
CCACCGAGTC	CAGTGGACGT	GACCAAGCTC	GGGCCGGAGG	CGCAGGAGAT	GCGGGAGGGC
250	260	270	280	290	300
CTCATCCGCC	TATGCTCCGA	GGCCGAGGGG	AAGCTGGAGG	CGCACTACTC	CGACATGCTC

310	320	330	340	350	360
GCCGCCTTCG ACAAGCCGCT GGATCACCTC GGCATGTTCC CCTACTACAA CAACTACATC					
370	380	390	400	410	420
AACCTCAGCA AGCTCGAGTA CGAGCTCCTG GCCCCTACG TGCCTGGCGG CTATCGCCCG					
430	440	450	460	470	480
GCGCGCGTCG CGTTCATCGG CTCCGGCCCG CTGCCGTTCA GTCCTTTGT CCTGGCCGCG					
490	500	510	520	530	540
CGCCACCTGC CCGACACCAT GTTCGACAAC TATGACCTGT GCGGTGCGGC CAACGATCGC					
550	560	570	580	590	600
GCCAGCAAGC TCTTCCGCGC GGATCGCGAC GTGGGTGCCC GCATGTCGTT CCACACGGCC					
610	620	630	640	650	660
GACGTCGCGG ACCTCGCCGG CGAGCTCGCC AAGTACGACG TTGTCTTCCT GGCCGCACTC					
670	680	690	700	710	720
GTCGGCATGG CCGCCGAGGA CAAGGCGAAG GTGATCGCGC ACCTCGGCGC ACACATGGCA					
730	740	750	760	770	780
GACGGGGCGG CCCTCGTCGT GCGCAGCGCA CACGGAGCGC GCGGGTTCCT GTACCCGATC					
790	800	810	820	830	840
GTCGACCCCC AGGACATCGG CCGAGGCGGG TTCGAGGTGC TGGCCGTGTG CCATCCCGAC					
850	860	870	880	890	900

GACGACGTGG TGAAGTCCGT CATCATCGCA CAGAAGTCCA AGGACGTGCA TGCCGATGGA

910 920 930 940 950 960
CTTGGCAGCG GGCCTGGTGC CGGTGGACAG TACGCGCGGG GCACGGTGCC TGTGTGTCAGC

970 980 990 1000 1010 1020
CCCCCGTGCA GGTTCGGCGA GATGGTGGCG GACGTGACCC AGAACCACAA GAGAGACGAG

1030 1040 1050 1060 1070 1080
TTTGCCAACG CCGAAGTGGC CTTTGATCG TTCGCTGCGA GGGTGTGCAT CCATGATCCA

1090 1100 1110 1120 1130 1140
TCCATACCTC GTTCTGTGAT TGCATCAAGC TTGCAATCGT ATGCATTTCA AGTCACGTGT

1150 1160 1170 1180 1190 1200
TGCTTCTATC CAATAATGTA CGTGTGGTGT TTACACGCGA ATGTCTTGTA GACCTTTGTA

1210 1220 1230 1240 1250 1260
TGTGTACAAG TGAATTTTAA TTCACAAGTA CATATAATGG TCACCATTGA AAAGATGTTT

1270 1280 1290 1300 1310 1320
AGTGTGTGTT TTCCAATATA TGTTTGTGTA AGGTTTCATCA TCTAATAAAA TATGTTTGGA

1330 1340 1350 1360 1370 1380
ACCCAAAAAA AAAAAAAAAA AA.....

配列番号 : 5

配列の長さ : 3 3 5

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：オオムギ

配列

Met Ala Ala Gln Asn Asn Asn Lys Asp Val Ala Ala Leu Val Glu	15
Lys Ile Thr Gly Leu His Ala Ala Ile Ala Lys Leu Pro Ser Leu	30
Ser Pro Ser Pro Asp Val Asp Ala Leu Phe Thr Glu Leu Val Thr	45
Ala Cys Val Pro Pro Ser Pro Val Asp Val Thr Lys Leu Gly Pro	60
Glu Ala Gln Glu Met Arg Glu Gly Leu Ile Arg Leu Cys Ser Glu	75
Ala Glu Gly Lys Leu Glu Ala His Tyr Ser Asp Met Leu Ala Ala	90
Phe Asp Asn Pro Leu Asp His Leu Gly Ile Phe Pro Tyr Tyr Ser	105
Asn Tyr Ile Asn Leu Ser Lys Leu Glu Tyr Glu Leu Leu Ala Arg	120
Tyr Val Arg Arg His Arg Pro Ala Arg Val Ala Phe Ile Gly Ser	135
Gly Pro Leu Pro Phe Ser Ser Phe Val Leu Ala Ala Arg His Leu	150
Pro Asp Thr Met Phe Asp Asn Tyr Asp Leu Cys Gly Ala Ala Asn	165
Asp Arg Ala Ser Lys Leu Phe Arg Ala Asp Thr Asp Val Gly Ala	180
Arg Met Ser Phe His Thr Ala Asp Val Ala Asp Leu Ala Ser Glu	195
Leu Ala Lys Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met	210
Ala Ala Glu Asp Lys Ala Lys Val Ile Ala His Leu Gly Ala His	225
Met Ala Asp Gly Ala Ala Leu Val Val Arg Ser Ala His Gly Ala	240
Arg Gly Phe Leu Tyr Pro Ile Val Asp Pro Gln Asp Ile Gly Arg	255
Gly Gly Phe Glu Val Leu Ala Val Cys His Pro Asp Asp Asp Val	270
Val Asn Ser Val Ile Ile Ala Gln Lys Ser Lys Glu Val His Ala	285
Asp Gly Leu Gly Ser Ala Arg Gly Ala Gly Arg Gln Tyr Ala Arg	300
Gly Thr Val Pro Val Val Ser Pro Pro Cys Arg Phe Gly Glu Met	315
Val Ala Asp Val Thr Gln Asn His Lys Arg Asp Glu Phe Ala Asn	330
Ala Glu Val Ala Phe	335

配列番号 : 6

配列の長さ : 1314

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

起源

生物名 : オオムギ

配列

10	20	30	40	50	60
CTACTTCACT CACACTAGTG CCCAGAAAGA AGGCTGCAAT GGCTGCCCAG AACAAACAACA					
70	80	90	100	110	120
AGGATGTCGC TGCCCTGGTG GAGAAGATCA CCGGGCTCCA CGCCGCCATC GCCAAGCTGC					
130	140	150	160	170	180
CGTCGCTCAG CCCATCCCCG GACGTCGACG CGCTCTTCAC CGAGCTGGTC ACGGCGTGCG					
190	200	210	220	230	240
TTCCCCCGAG CCCCCTGGAC GTGACCAAGC TCGGCCCCGA GGCGCAGGAG ATGCGGGAGG					
250	260	270	280	290	300
GCCTCATCCG CCTCTGCTCC GAGGCCGAGG GGAAGCTGGA GGCGCACTAC TCCGACATGC					
310	320	330	340	350	360
TCGCCGCCTT CGACAACCCG CTGGATCACC TCGGCATCTT CCCCTACTAC AGCAACTACA					
370	380	390	400	410	420
TCAACCTCAG CAAGCTGGAG TACGAGCTCC TGGCACGCTA CGTCCGGCGG CATCGCCCGG					

430	440	450	460	470	480
CCCGCGTCGC GTTCATCGGC TCCGGCCCGC TGCCGTTTCTC CTCTTTTGTG CTGGCCGCGC					
490	500	510	520	530	540
GCCACCTGCC CGACACCATG TTTGACAACT ACGACCTTTG CGGCGCGGCC AACGATCGCG					
550	560	570	580	590	600
CCAGCAAGCT CTTCCGCGCG GACACGGACG TGGGTGCCCC CATGTCGTTC CACACGGCCG					
610	620	630	640	650	660
ACGTCGCGGA CCTCGCCAGC GAGCTCGCCA AGTACGACGT CGTCTTCCTG GCCGCGCTCG					
670	680	690	700	710	720
TCGGCATGGC CGCCGAGGAC AAGGCCAAGG TGATCGCGCA CCTCGGCGCA CACATGGCAG					
730	740	750	760	770	780
ACGGGGCGGC CCTCGTCGTG CGCAGCGCAC ACGGAGCGCG CGGGTTCCTG TACCCGATTG					
790	800	810	820	830	840
TCGACCCCCA GGACATCGGC CGCGGCGGGT TCGAGGTGCT GGCCGTGTGC CACCCGACG					
850	860	870	880	890	900
ACGACGTGGT GAACTCCGTC ATCATCGCAC AGAAGTCCAA GGAGGTGCAT GCCGATGGAC					
910	920	930	940	950	960
TTGGCAGCGC GCGTGGTGCC GGTGACAGT ACGCGCGCGG CACGGTGCCG GTTGTACGCC					
970	980	990	1000	1010	1020

CCCCGTGCAG GTTCGGTGAG ATGGTGGCGG ATGTGACCCA GAACCACAAG AGAGACGAGT

1030 1040 1050 1060 1070 1080
TTGCCAACGC CGAAGTGGCC TTTTGATCGA TCGTCGCCAA GGGACAATAA ATGAACGTGG

1090 1100 1110 1120 1130 1140
ATGTGGTAGG GTAATTTGCC TACCTCGCTG CTTGATCGCT TGCAATATGT GCACATTTTC

1150 1160 1170 1180 1190 1200
CTACTACCGC TGCTTATGCA TTTCAAGCCA TGTGATGTTG GTATCCAATA AAGTATGTGT

1210 1220 1230 1240 1250 1260
AGGGTTTACA CGCAAATGTC TTTACACCTT GTACGTGTAA GTGTTGACAA CGATGAATTT

1270 1280 1290 1300 1310 1320
CAGTTCACAA TTAATAAATA GTATAATGGA TTCAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAA.....

配列番号：7

配列の長さ：329

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：オオムギ

配列

Met Asp Gly Gln Ser Glu Glu Val Asp Ala Leu Val Gln Lys Ile	15
Thr Gly Leu His Ala Ala Ile Ala Lys Leu Pro Ser Leu Ser Pro	30
Ser Pro Asp Val Asp Ala Leu Phe Thr Asp Leu Val Thr Ala Cys	45

Val Pro Pro Ser Pro Val Asp Val Thr Lys Leu Ala Pro Glu Ala	60
Gln Ala Met Arg Glu Gly Leu Ile Arg Leu Cys Ser Glu Ala Glu	75
Gly Lys Leu Glu Ala His Tyr Ser Asp Met Leu Ala Ala Phe Asp	90
Asn Pro Leu Asp His Leu Gly Val Phe Pro Tyr Tyr Ser Asn Tyr	105
Ile Asn Leu Ser Lys Leu Glu Tyr Glu Leu Leu Ala Arg Tyr Val	120
Pro Gly Arg His Arg Pro Ala Arg Val Ala Phe Ile Gly Ser Gly	135
Pro Leu Pro Phe Ser Ser Tyr Val Leu Ala Ala Arg His Leu Pro	150
Asp Thr Val Phe Asp Asn Tyr Asp Leu Cys Gly Ala Ala Asn Asp	165
Arg Ala Thr Arg Leu Phe Arg Ala Asp Lys Asp Val Gly Ala Arg	180
Met Ser Phe His Thr Ala Asp Val Ala Asp Leu Thr Asp Glu Leu	195
Ala Thr Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met Ala	210
Ala Glu Asp Lys Ala Lys Val Ile Ala His Leu Gly Ala His Met	225
Ala Asp Gly Ala Ala Leu Val Ala Arg His Gly Ala Arg Gly Phe	240
Leu Tyr Pro Ile Val Asp Pro Gln Asp Ile Gly Arg Gly Gly Phe	255
Glu Val Leu Ala Val Cys His Pro Asp Asp Asp Val Val Asn Ser	270
Val Ile Ile Ala Gln Lys Ser Asn Asp Val His Glu Tyr Gly Leu	285
Gly Ser Gly Arg Gly Gly Arg Tyr Ala Arg Gly Thr Val Val Pro	300
Val Val Ser Pro Pro Cys Arg Phe Gly Glu Met Val Ala Asp Val	315
Thr Gln Lys Arg Glu Glu Phe Ala Asn Ala Glu Val Ala Phe	329

配列番号 : 8

配列の長さ : 1 2 4 9

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

起源

生物名 : オオムギ

配列

10	20	30	40	50	60
CCACTACCGA CTACCGTAGT ACCGTGCCTC AGAGCTCATC ACTGGTCAGG TACCAAGAAG					
70	80	90	100	110	120
ACATAAAAAAT GGACGGCCAG AGCGAGGAGG TCGACGCCCT TGTCCAGAAG ATCACC GGCC					
130	140	150	160	170	180
TCCACGCCGC CATCGCCAAG CTGCCCTCGC TCAGCCCGTC CCCGGACGTC GACGCGCTCT					
190	200	210	220	230	240
TCACCGACCT GGTCACCGCG TCGTGCCCC CGAGCCCCGT GGACGTGACC AAGCTCGCCC					
250	260	270	280	290	300
CGGAGGCGCA GGCGATGCGG GAGGGCCTCA TCCGCCTCTG CTCCGAGGCC GAGGGCAAGC					
310	320	330	340	350	360
TGGAGGCGCA CTA CTCCGAC ATGCTCGCCG CCTTCGACAA CCCGCTCGAC CACCTCGCGG					
370	380	390	400	410	420
TCTTCCCCTA CTACAGCAAC TACATCAACC TCAGCAAGCT TGAGTACGAG CTCCTCGCGC					
430	440	450	460	470	480
GCTACGTGCC CGGCAGGCAT CGCCCGGCC GCGTCGCCTT CATCGGCTCC GGCCCGCTGC					
490	500	510	520	530	540
CGTTCAGCTC CTACGTCTC GCCGCGCGCC ACCTGCCCGA CACCGTGTT GACAACTACG					
550	560	570	580	590	600
ACCTGTGCGG CGCGGCCAAC GACCGCGCGA CCAGGCTGTT CCGCGCGGAC AAGGACGTGC					

610 620 630 640 650 660
GCGCCCGCAT GTCGTTCCAC ACCGCCGACG TCGCGGACCT CACCGACGAG CTCGCTACGT

670 680 690 700 710 720
ACGACGTCGT CTTCTGGCC GCGCTCGTGG GCATGGCCGC CGAGGACAAG GCCAAGGTGA

730 740 750 760 770 780
TCGCGCACCT TGGCGCGCAC ATGGCGGACG GGGCGGCCCT CGTTGCGCGG CACGGCGCGC

790 800 810 820 830 840
GTGGGTTTCT CTACCCGATC GTCGATCCCC AGGACATCGG TCGAGGCGGG TTCGAGGTGC

850 860 870 880 890 900
TCGCCGTGTG TCACCCCGAC GACGACGTGG TGAACTCCGT CATCATCGCA CAAAAGAGCA

910 920 930 940 950 960
ACGACGTGCA CGAGTATGGA CTTGGCAGCG GGCGTGGTGG ACGGTACGCG CGAGGCACGG

970 980 990 1000 1010 1020
TGGTGCCGGT GGTCAGCCCA CCCTGCAGGT TCGGCGAGAT GGTGGCAGAC GTGACCCAGA

1030 1040 1050 1060 1070 1080
AGAGAGAGGA GTTTGCCAAC GCGGAAGTGG CCTTCTGATT GCTGCTGAAT CGCTTGTGAT

1090 1100 1110 1120 1130 1140
CGTACGTGGT AATTTTCTA CTACTCCTCC TCCTACCACC ACCTATCACC TATGTATGCA

1150 1160 1170 1180 1190 1200

TTTCAAGTCG TGTGTTGTTT GTATCCAATA ATGTAAGTGA GATGTTTACA CGCGCAAAAA

1210 1220 1230 1240 1250 1260
 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA.

配列番号 : 9

配列の長さ : 267

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

生物名 : オオムギ

配列

Met Glu Ala Glu Asn Gly Glu Val Ala Ala Leu Val Glu Lys Ile	15
Thr Gly Leu His Ala Ala Ile Ser Lys Leu Pro Ala Leu Ser Pro	30
Ser Pro Gln Val Asp Ala Leu Phe Thr Glu Leu Val Ala Ala Cys	45
Val Pro Ser Ser Pro Val Asp Val Thr Lys Leu Gly Pro Glu Ala	60
Gln Glu Met Arg Gln Asp Leu Ile Arg Leu Cys Ser Ala Ala Glu	75
Gly Leu Leu Glu Ala His Tyr Ser Asp Met Leu Thr Ala Leu Asp	90
Ser Pro Leu Asp His Leu Gly Arg Phe Pro Tyr Phe Asp Asn Tyr	105
Val Asn Leu Ser Lys Leu Glu His Asp Leu Leu Ala Gly His Trp	120
Phe Ser Ser Leu Phe Leu Ala Thr Tyr His Leu Pro Asp Thr Arg	135
Phe Asp Asn Tyr Asp Arg Cys Ser Val Ala Asn Gly Arg Ala Met	150
Lys Leu Val Gly Ala Ala Asp Glu Gly Val Arg Ser Arg Met Ala	165
Phe His Thr Ala Glu Val Thr Asp Leu Thr Ala Glu Leu Gly Ala	180
Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met Thr Ser Lys	195
Glu Lys Ala Asp Ala Ile Ala His Leu Gly Lys His Met Ala Asp	210
Gly Ala Val Leu Arg Ala Arg Ser Ala His Gly Ala Arg Ala Phe	225

Leu Tyr Pro Val Val Glu Leu Asp Asp Val Gly Arg Gly Gly Phe	240
Gln Val Leu Ala Val His His Pro Ala Gly Asp Glu Val Phe Asn	255
Ser Phe Ile Val Ala Arg Lys Val Lys Met Ser Ala	267

配列番号 : 10

配列の長さ : 1122

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

起源

生物名 : オオムギ

配列

10	20	30	40	50	60
ATCAATTGCA	ATTCCATTGA	TTTCCCCTC	ATATTTTATC	AAGCATCAGC	TCCATCATAC
70	80	90	100	110	120
CACTACAGTC	TACATTTTTT	TCCTTCTAGA	AAAGCACTAC	AACACCAGCC	ATACCTACTT
130	140	150	160	170	180
GGCAATCAAG	TGACATGGAG	GCCGAAAACG	GCGAGGTGGC	TGCTCTGGTC	GAGAAGATCA
190	200	210	220	230	240
CCGGTCTCCA	CGCCGCCATC	TCCAAGCTCC	CGGCACTAAG	CCCGTCTCCT	CAAGTCGACG
250	260	270	280	290	300
CGCTCTTCAC	CGAGCTGGTT	GCGGCGTGCG	TCCCATCAAG	CCCGGTGGAC	GTGACCAAGC
310	320	330	340	350	360
TCGGCCCCGA	GGCGCAGGAG	ATGCGGCAGG	ACCTCATCCG	TCTCTGCTCG	GCCGCCGAGG

370 380 390 400 410 420
GGCTGCTCGA GGCGCACTAC TCCGACATGC TCACCGCGTT GGACAGCCCG CTCGACCACC

430 440 450 460 470 480
TCGGCCGCTT CCCTTACTTC GACAACTACG TCAACCTCAG CAAGCTCGAG CACGATCTTC

490 500 510 520 530 540
TGGCAGGCCA CTGGTTCAGC TCGCTCTTCC TTGCGACGTA CCACCTGCCG GACACCCGGT

550 560 570 580 590 600
TCGACAACTA CGACCGGTGC AGCGTGCCGA ATGGCCGGGC GATGAAGCTG GTCGGCGCGG

610 620 630 640 650 660
CGGACGAGGG CGTGCGATCA CGCATGGCGT TCCACACGGC CGAAGTCACG GACCTCACGG

670 680 690 700 710 720
CTGAGCTCGG CGCTTACGAC GTGGTCTTCC TGGCCGCGCT CGTGGGAATG ACGTCCAAGG

730 740 750 760 770 780
AGAAGGCCGA CGCCATAGCG CACTTGGGGA AGCACATGGC AGATGGGGCG GTGCTTCGTG

790 800 810 820 830 840
CGCGAAGCGC GCACGGGGCG CGAGCGTTCC TGTATCCTGT CGTGGAGCTG GACGATGTGG

850 860 870 880 890 900
GGCGTGGTGG GTTCCAAGTG CTGGCCGTGC ACCACCCTGC AGGCGATGAG GTGTTCAACT

910 920 930 940 950 960

CATTCATAGT TGCCCGGAAG GTGAAAATGA GTGCTTAAAT TAAGAAAAGG GTGAGCCTGT

970 980 990 1000 1010 1020
CTGCTTGTGC AAATGGTGTC TCACATTGAT AATAACCAGA TGATACCCTG CACATTGATG

1030 1040 1050 1060 1070 1080
GGGGTACTTG CAGTATGTTT CAATGAGGTC TGGTTGTATC AAATATGAGT ATTTGGCTTA

1090 1100 1110 1120 1130 1140
ATAATATCAG CGAATATGTT TCGATTAAAA AAAAAAAAAA AA.....

配列番号 : 1 1

配列の長さ : 2 8 2

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

生物名 : オオムギ

配列

Met Glu Ala Glu Asn Gly Glu Val Ala Ala Leu Val Glu Lys Ile	15
Thr Gly Leu His Ala Ala Ile Ser Lys Leu Pro Ala Leu Ser Pro	30
Ser Pro Gln Val Asp Ala Leu Phe Thr Glu Leu Val Ala Ala Cys	45
Val Pro Ser Ser Pro Val Asp Val Thr Lys Leu Gly Pro Glu Ala	60
Gln Glu Met Arg Gln Asp Leu Ile Arg Leu Cys Ser Ala Ala Glu	75
Gly Leu Leu Glu Ala His Tyr Ser Asp Met Leu Thr Ala Leu Asp	90
Ser Pro Leu Asp His Leu Gly Arg Phe Pro Tyr Phe Asp Asn Tyr	105
Val Asn Leu Ser Lys Leu Glu His Asp Leu Leu Ala Gly His Val	120
Ala Ala Pro Ala Arg Val Ala Phe Ile Gly Ser Gly Pro Leu Pro	135

Phe Ser Ser Leu Phe Leu Ala Thr Tyr His Leu Pro Asp Thr Arg	150
Phe Asp Asn Tyr Asp Arg Cys Ser Val Ala Asn Gly Arg Ala Met	165
Lys Leu Val Gly Ala Ala Asp Glu Gly Val Arg Ser Arg Met Ala	180
Phe His Thr Ala Glu Val Thr Asp Leu Thr Ala Glu Leu Gly Ala	195
Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met Thr Ser Lys	210
Glu Lys Ala Asp Ala Ile Ala His Leu Gly Lys His Met Ala Asp	225
Gly Ala Val Leu Val Arg Glu Ala Leu His Gly Ala Arg Ala Phe	240
Leu Tyr Pro Val Val Glu Leu Asp Asp Val Gly Arg Gly Gly Phe	255
Gln Val Leu Ala Val His His Pro Ala Gly Asp Glu Val Phe Asn	270
Ser Phe Ile Val Ala Arg Lys Val Lys Met Ser Ala	282

配列番号 : 12

配列の長さ : 1044

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

起源

生物名 : オオムギ

配列

10	20	30	40	50	60
GTGACATGGA GGCCGAAAAC GGCGAGGTGG CTGCTCTGGT CGAGAAGATC ACCGGTCTCC					
70	80	90	100	110	120
ACGCCGCCAT CTCCAAGCTC CCGGCACTAA GCCCGTCTCC TCAAGTCGAC GCGCTCTTCA					
130	140	150	160	170	180
CCGAGCTGGT TGCGGCGTGC GTCCCATCAA GCCCGGTGGA CGTGACCAAG CTCGGCCCCG					
190	200	210	220	230	240

AGGCGCAGGA GATGCGGCAG GACCTCATCC GTCTCTGCTC GGCCGCCGAG GGGCTGCTCG

250 260 270 280 290 300
AGGCGCACTA CTCCGACATG CTCACCGCGT TGGACAGCCC GCTCGACCAC CTCGGCCGCT

310 320 330 340 350 360
TCCCTTACTT CGACAACTAC GTCAACCTCA GCAAGCTCGA GCACGATCTT CTGGCAGGTC

370 380 390 400 410 420
ACGTGGCGGC CCCGGCCCCG GTGGCGTTCA TCGGGTCGGG GCCACTGCCG TTCAGCTCGC

430 440 450 460 470 480
TCTTCCTTGC GACGTACCAC CTGCCGGACA CCCGGTTCGA CAACTACGAC CGGTGCAGCG

490 500 510 520 530 540
TGGCGAATGG CCGGGCGATG AAGCTGGTCG GCGCGGCGGA CGAGGGCGTG CGATCACGCA

550 560 570 580 590 600
TGGCGTTCCA CACGGCCGAA GTCACGGACC TCACGGCTGA GCTCGGCGCT TACGACGTGG

610 620 630 640 650 660
TCTTCCTGGC CGCGCTCGTG GGAATGACGT CCAAGGAGAA GGCCGACGCC ATAGCGCACT

670 680 690 700 710 720
TGGGGAAGCA CATGGCAGAT GGGGCGGTGC TCGTGC CGCA AGCGCTGCAC GGGGCGCGAG

730 740 750 760 770 780
CGTTCCTGTA TCCTGTCGTG GAGCTGGACG ATGTCGGGCG TGGTGGGTTC CAAGTGCTGG

790	800	810	820	830	840
CCGTGCACCA CCCTGCAGGC GATGAGGTGT TCAACTCATT CATAGTTGCC CGGAAGGTGA					
850	860	870	880	890	900
AAATGAGTGC TTAAATTAAG AAAAGGGTGA GCCTGTCTGC TTGTGCAAAT GGTGTCTCAC					
910	920	930	940	950	960
ATTGATAATA ACCAGATGAT ACCCTGCACA TTGATGGGGG TACTGCAGTA TGTTTCAATG					
970	980	990	1000	1010	1020
AGGTCTGGTT GTATCAAATA TGAGTATTTG GCTTAATAAT ATCAGCGAAT ATGTTTCGAT					
1030	1040	1050	1060	1070	1080
TAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAA.....					

配列番号 : 13

配列の長さ : 328

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

生物名 : オオムギ

配列

Met Asp Ala Gln Asn Lys Glu Val Asp Ala Leu Val Gln Lys Ile	15
Thr Gly Leu His Ala Ala Ile Ala Lys Leu Pro Ser Leu Ser Pro	30
Ser Pro Asp Val Asp Ala Leu Phe Thr Asp Leu Val Thr Ala Cys	45
Val Pro Pro Ser Pro Val Asp Val Thr Lys Leu Gly Ser Glu Ala	60
Gln Glu Met Arg Glu Gly Leu Ile Arg Leu Cys Ser Glu Ala Glu	75

Gly Lys Leu Glu Ala His Tyr Ser Asp Met Leu Ala Ala Phe Asp	90
Asn Pro Leu Asp His Leu Gly Met Phe Pro Tyr Tyr Ser Asn Tyr	105
Ile Asn Leu Ser Lys Leu Glu Tyr Glu Leu Leu Ala Arg Tyr Val	120
Pro Gly Gly Ile Ala Arg Pro Ala Val Ala Phe Ile Gly Ser Gly	135
Pro Leu Pro Phe Ser Ser Tyr Val Leu Ala Ala Arg His Leu Pro	150
Asp Ala Met Phe Asp Asn Tyr Asp Leu Cys Ser Ala Ala Asn Asp	165
Arg Ala Ser Lys Leu Phe Arg Ala Asp Lys Asp Val Gly Ala Arg	180
Met Ser Phe His Thr Ala Asp Val Ala Asp Leu Thr Arg Glu Leu	195
Ala Ala Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met Ala	210
Ala Glu Asp Lys Ala Lys Val Ile Pro His Leu Gly Ala His Met	225
Ala Asp Gly Ala Ala Leu Val Val Arg Ser Ala Gln Ala Arg Gly	240
Phe Leu Tyr Pro Ile Val Asp Pro Gln Asp Ile Gly Arg Gly Gly	255
Phe Glu Val Leu Ala Val Cys His Pro Asp Asp Asp Val Val Asn	270
Ser Val Ile Ile Ala His Lys Ser Lys Asp Val His Ala Asn Glu	285
Arg Pro Asn Gly Arg Gly Gly Gln Tyr Arg Gly Ala Val Pro Val	300
Val Ser Pro Pro Cys Arg Phe Gly Glu Met Val Ala Asp Val Thr	315
His Lys Arg Glu Glu Phe Thr Asn Ala Glu Val Ala Phe	328

配列番号：14

配列の長さ：1352

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

起源

生物名：オオムギ

配列

10	20	30	40	50	60
CTCCACTTCG CTCCTGTGCC TCAGGTAGCC ACAACATACA GTATTAAAAT GGATGCCCAG					

70	80	90	100	110	120
AACAAGGAGG TTGATGCCCT GGTCCAGAAG ATCACCGGCC TCCACGCCGC CATCGCCAAG					
130	140	150	160	170	180
CTGCCGTCCC TCAGCCCATC ACCCGACGTC GACGCGCTCT TCACCGACCT GGTCACCGCG					
190	200	210	220	230	240
TGCGTCCCC CGAGCCCCGT GGACGTGACC AAGCTCGGGT CGGAGGCGCA GGAGATGCGG					
250	260	270	280	290	300
GAGGGCCTCA TCCGCCTCTG CTCCGAGGCC GAGGGGAAGC TGGAGGCGCA CTACTCCGAC					
310	320	330	340	350	360
ATGCTGGCCG CCTTCGACAA CCCGCTCGAC CACCTCGGCA TGTTCCCCTA CTACAGCAAC					
370	380	390	400	410	420
TACATCAACC TCAGCAAGCT GGAGTACGAG CTCCTGGCGC GCTACGTGCC GGGCGGCATC					
430	440	450	460	470	480
GCCCCGCCCC CTGTCGCGTT CATCGGCTCC GGCCCGCTGC CGTTCAGCTC CTACGTCCTC					
490	500	510	520	530	540
GCCGCTCGCC ACCTGCCCCG CGCCATGTTC GACAACTACG ACCTGTGTAG CGCGGCCAAC					
550	560	570	580	590	600
GACCGTGCGA GCAAGCTGTT CCGCGCGGAC AAGGACGTGG GCGCCCGCAT GTCTTTCCAC					
610	620	630	640	650	660

ACCGCCGACG TAGCGGACCT CACCCGCGAG CTCGCCGCGT ACGACGTCGT CTTCTGGCC

670 680 690 700 710 720
GCGCTCGTGG GCATGGCTGC CGAGGACAAG GCCAAGGTGA TTCCGCACCT CGGCGCGCAC

730 740 750 760 770 780
ATGGCGGACG GGGCGGCCCT CGTCGTGCGC AGTGCGCAGG CACGTGGGT CCTCTACCCG

790 800 810 820 830 840
ATCGTCGATC CCCAGGACAT CGGTCGAGGC GGGTTTGAGG TGCTGGCCGT GTGTCACCCC

850 860 870 880 890 900
GACGATGACG TGGTGAAGTC CGTCATCATC GCACACAAGT CCAAGGACGT GCATGCCAAT

910 920 930 940 950 960
GAACGTCCCA ACGGGCGTGG TGGACAGTAC CGGGGCGCGG TACCGGTGGT CAGCCCGCCG

970 980 990 1000 1010 1020
TGCAGGTTTCG GTGAGATGGT GGCGGACGTG ACCCACAAGA GAGAGGAGTT CACCAACGCG

1030 1040 1050 1060 1070 1080
GAAGTGGCCT TCTGATCGTT GCGAGGGAAT GAAAATGAAG GTGGACGTGT GTGGTCAGCA

1090 1100 1110 1120 1130 1140
TCCATACGTG GCTGCCTGCT TCATCGCTTG CAATCGTACT ACTACCTACC TATGCAGTTC

1150 1160 1170 1180 1190 1200
AAGTCATGTG TTGTCAATGT AAGTGTGATG TTTACACTAG TCTATGAAAG GCAGGGCAGA

1210	1220	1230	1240	1250	1260
CGAGGGTAGT	GTGCCAAGTA	ACAGTGTGTC	ATTATAGGTG	TAAGTGGTGA	GAATAAGACC
1270	1280	1290	1300	1310	1320
ATTTTGTTC	ACAAATAGTA	TGATGTAATC	GGTGTCATAT	TCGTATTGAG	TACATTGTC
1330	1340	1350	1360	1370	1380
AAGTTGGTTG	CTAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AA.....

配列番号 : 15

配列の長さ : 320

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

生物名 : アラビドプシス

配列

Met Ala Cys Gln Asn Asn Leu Val Val Lys Gln Ile Ile Asp Leu	15
Tyr Asp Gln Ile Ser Lys Leu Lys Ser Leu Lys Pro Ser Lys Asn	30
Val Asp Thr Leu Phe Gly Gln Leu Val Ser Thr Cys Leu Pro Thr	45
Asp Thr Asn Ile Asp Val Thr Asn Met Cys Glu Glu Val Lys Asp	60
Met Arg Ala Asn Leu Ile Lys Leu Cys Gly Glu Ala Glu Gly Tyr	75
Leu Glu Gln His Phe Ser Thr Ile Leu Gly Ser Leu Gln Glu Asp	90
Gln Asn Pro Leu Asp His Leu His Ile Phe Pro Tyr Tyr Ser Asn	105
Tyr Leu Lys Leu Gly Lys Leu Glu Phe Asp Leu Leu Ser Gln His	120
Ser Ser His Val Pro Thr Lys Ile Ala Phe Val Gly Ser Gly Pro	135
Met Pro Leu Thr Ser Ile Val Leu Ala Lys Phe His Leu Pro Asn	150

Thr Thr Phe His Asn Phe Asp Ile Asp Ser His Ala Asn Thr Leu	165
Ala Ser Asn Leu Val Ser Arg Asp Pro Asp Leu Ser Lys Arg Met	180
Ile Phe His Thr Thr Asp Val Leu Asn Ala Thr Glu Ala Leu Asp	195
Gln Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met Asp Lys	210
Glu Ser Lys Val Lys Ala Ile Glu His Leu Glu Lys His Met Ala	225
Pro Gly Ala Val Leu Met Leu Arg Arg Ala His Ala Leu Arg Ala	240
Phe Leu Tyr Pro Ile Val Asp Ser Ser Asp Leu Lys Gly Phe Gln	255
Leu Leu Thr Ile Tyr His Pro Thr Asp Asp Val Val Asn Ser Val	270
Val Ile Ala Arg Lys Leu Gly Gly Pro Thr Thr Pro Gly Val Asn	285
Gly Thr Arg Gly Cys Met Phe Met Pro Cys Asn Cys Ser Lys Ile	300
His Ala Ile Met Asn Asn Arg Gly Lys Lys Asn Met Ile Glu Glu	315
Phe Ser Thr Ile Glu	320

配列番号 : 16

配列の長さ : 963

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

起源

生物名 : アラピドプシス

配列

ATGGCTTGCC AAAACAATCT CGTTGTGAAG CAAATCATCG ACTTGACGA CCAAATCTCA	60
AAGCTCAAGA GCTTAAAACC TTCCAAAAAT GTCGACACTT TGTTCCGACA ACTCGTGTCC	120
ACGTGCTTAC CCACGGATAC AAACATCGAT GTCACAAATA TGTGTGAAGA AGTCAAAGAC	180
ATGAGAGCTA ATCTCATCAA GCTTTGTGGT GAAGCCGAAG GTTATTTGGA GCAACACTTC	240
TCCACAATTT TGGGATCTTT ACAAGAAGAC CAAAACCCAC TTGACCATT ACACATCTTT	300
CCTTACTACT CCAACTACCT CAAGCTAGGC AAGCTCGAGT TCGATCTCCT GAGCCAACAC	360
TCAAGCCATG TCCCCACCAA GATTGCCTTC GTGGGTTTCG GTCCGATGCC TCTCACATCC	420

ATCGTATTGG CCAAGTTTCA CCTCCCCAAC ACGACGTTCC ACAACTTTGA CATCGACTCA	480
CACGCAAACA CACTCGCTTC AAACCTCGTC TCTCGCGACC CGGACCTCTC AAAACGCATG	540
ATCTTCCACA CAACGGACGT ACTAAACGCA ACCGAAGCCC TTGACCAATA TGACGTCGTT	600
TTCTTAGCGG CGCTTGTAGG GATGGACAAA GAGTCAAAGG TCAAAGCCAT CGAGCACTTG	660
GAGAAACACA TGGCTCCTGG AGCTGTTCTT ATGCTAAGGA GGGCTCATGC TCTCAGAGCT	720
TTCTTATATC CAATCGTTGA CTCGTCTGAT CTCAAAGGCT TTCAACTCTT GACCATCTAT	780
CATCCAACCG ATGACGTGGT TAACTCGGTT GTGATCGCAC GTAAGCTCGG TGGTCCGACC	840
ACGCCCCGGG TTAATGGTAC TCGTGGATGC ATGTTTATGC CTTGTAAGT CTCCAAGATT	900
CACGCGATCA TGAACAACCG TGGTAAGAAG AATATGATCG AGGAGTTTAG TACCATCGAG	960
TAA	963

配列番号 : 17

配列の長さ : 320

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

生物名 : アラビドプシス

配列

Met Ala Cys Gln Asn Asn Leu Val Val Lys Gln Ile Met Asp Leu	15
Tyr Asn Gln Ile Ser Asn Leu Glu Ser Leu Lys Pro Ser Lys Asn	30
Val Asp Thr Leu Phe Arg Gln Leu Val Ser Thr Cys Leu Pro Thr	45
Asp Thr Asn Ile Asp Val Thr Glu Ile His Asp Glu Lys Val Lys	60
Asp Met Arg Ser His Leu Ile Lys Leu Cys Gly Glu Ala Glu Gly	75
Tyr Leu Glu Gln His Phe Ser Ala Ile Leu Gly Ser Phe Glu Asp	90
Asn Pro Leu Asn His Leu His Ile Phe Pro Tyr Tyr Asn Asn Tyr	105
Leu Lys Leu Gly Lys Leu Glu Phe Asp Leu Leu Ser Gln His Thr	120
Thr His Val Pro Thr Lys Val Ala Phe Ile Gly Ser Gly Pro Met	135

Pro Leu Thr Ser Ile Val Leu Ala Lys Phe His Leu Pro Asn Thr	150
Thr Phe His Asn Phe Asp Ile Asp Ser His Ala Asn Thr Leu Ala	165
Ser Asn Leu Val Ser Arg Asp Ser Asp Leu Ser Lys Arg Met Ile	180
Phe His Thr Thr Asp Val Leu Asn Ala Lys Glu Gly Leu Asp Gln	195
Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met Asp Lys Glu	210
Ser Lys Val Lys Ala Ile Glu His Leu Glu Lys His Met Ala Pro	225
Gly Ala Val Val Met Leu Arg Ser Ala His Gly Leu Arg Ala Phe	240
Leu Tyr Pro Ile Val Asp Ser Cys Asp Leu Lys Gly Phe Glu Val	255
Leu Thr Ile Tyr His Pro Ser Asp Asp Val Val Asn Ser Val Val	270
Ile Ala Arg Lys Leu Gly Gly Ser Asn Gly Ala Arg Gly Ser Gln	285
Ile Gly Arg Cys Val Val Met Pro Cys Asn Cys Ser Lys Val His	300
Ala Ile Leu Asn Asn Arg Gly Met Glu Lys Asn Leu Ile Glu Glu	315
Phe Ser Ala Ile Glu	320

配列番号 : 18

配列の長さ : 963

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

起源

生物名 : アラビドプシス

配列

ATGGCTTGCC AAAACAATCT CGTTGTGAAG CAAATCATGG ACTTATACAA CCAAATCTCA	60
AACCTCGAGA GCTTAAAACC ATCCAAGAAT GTCGACACTT TGTTTCAGACA ACTTGTGTCC	120
ACGTGCTTAC CAACGGACAC GAACATCGAT GTCACAGAGA TACACGATGA AAAAGTCAAA	180
GACATGAGAT CTCATCTCAT CAAGCTTTGT GGTGAAGCCG AAGGTTATTT AGAGCAACAC	240
TTTTTCAGCAA TCTTAGGCTC TTTTGAAGAC AACCTCTTAA ACCATTTACA CATCTTCCCC	300
TATTACAACA ACTATCTCAA ACTAGGCAAA CTCGAATTCG ATCTCCTTTC TCAGCACACA	360
ACCCATGTCC CGACCAAAGT CGCCTTTATT GGTTCGGGTC CGATGCCACT TACTTCCATC	420

GTCTTGGCCA AGTTCACCT CCCCAACACA ACGTTCCACA ACTTCGACAT CGACTCACAC	480
GCCAACACAC TCGCTTCAA CCTCGTTTCT CGTGATTCTG ACCTTTCCAA ACGCATGATT	540
TTCCACACAA CTGATGTATT AAACGCTAAG GAGGGGTTAG ACCAATACGA TGTGTGTTTC	600
TTGGCAGCTC TTGTTGGGAT GGATAAAGAG TCAAAGGTCA AAGCTATTGA GCATTTAGAG	660
AAGCATATGG CCCCTGGAGC TGTGGTGATG CTAAGAAGTG CTCATGGTCT TAGAGCTTTC	720
TTGTATCCAA TCGTTGACTC TTGTGATCTT AAAGGGTTG AGGTGTTAAC CATTATCAT	780
CCGTCTGACG ACGTGGTTAA TTCGGTGGTC ATCGCACGTA AGCTTGGTGG TTCAAATGGA	840
GCTCGAGGCA GCCAGATCGG ACGGTGTGTG GTTATGCCTT GTAATTGCTC TAAGGTCCAC	900
GCGATCTTGA ACAATCGTGG TATGGAGAAG AATTGATCG AGGAGTTTAG TGCCATCGAG	960
TAA	963

配列番号：19

配列の長さ：320

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：アラビドプシス

配列

Met Gly Cys Gln Asp Glu Gln Leu Val Gln Thr Ile Cys Asp Leu	15
Tyr Glu Lys Ile Ser Lys Leu Glu Ser Leu Lys Pro Ser Glu Asp	30
Val Asn Ile Leu Phe Lys Gln Leu Val Ser Thr Cys Ile Pro Pro	45
Asn Pro Asn Ile Asp Val Thr Lys Met Cys Asp Arg Val Gln Glu	60
Ile Arg Leu Asn Leu Ile Lys Ile Cys Gly Leu Ala Glu Gly His	75
Leu Glu Asn His Phe Ser Ser Ile Leu Thr Ser Tyr Gln Asp Asn	90
Pro Leu His His Leu Asn Ile Phe Pro Tyr Tyr Asn Asn Tyr Leu	105
Lys Leu Gly Lys Leu Glu Phe Asp Leu Leu Glu Gln Asn Leu Asn	120
Gly Phe Val Pro Lys Ser Val Ala Phe Ile Gly Ser Gly Pro Leu	135

Pro Leu Thr Ser Ile Val Leu Ala Ser Phe His Leu Lys Asp Thr	150
Ile Phe His Asn Phe Asp Ile Asp Pro Ser Ala Asn Ser Leu Ala	165
Ser Leu Leu Val Ser Ser Asp Pro Asp Ile Ser Gln Arg Met Phe	180
Phe His Thr Val Asp Ile Met Asp Val Thr Glu Ser Leu Lys Ser	195
Phe Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met Asn Lys Glu	210
Glu Lys Val Lys Val Ile Glu His Leu Gln Lys His Met Ala Pro	225
Gly Ala Val Leu Met Leu Arg Ser Ala His Gly Pro Arg Ala Phe	240
Leu Tyr Pro Ile Val Glu Pro Cys Asp Leu Gln Gly Phe Glu Val	255
Leu Ser Ile Tyr His Pro Thr Asp Asp Val Ile Asn Ser Val Val	270
Ile Ser Lys Lys His Pro Val Val Ser Ile Gly Asn Val Gly Gly	285
Pro Asn Ser Cys Leu Leu Lys Pro Cys Asn Cys Ser Lys Thr His	300
Ala Lys Met Asn Lys Asn Met Met Ile Glu Glu Phe Gly Ala Arg	315
Glu Glu Gln Leu Ser	320

配列番号：20

配列の長さ：963

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

起源

生物名：アラビドプシス

配列

ATGGGTTGCC AAGACGAACA ATTGGTGCAA ACAATATGCG ATCTCTACGA AAAGATCTCA	60
AAGCTTGAGA GTCTAAAACC ATCCGAAGAT GTCAACATTC TCTTCAAGCA GCTCGTTTCC	120
ACATGCATAC CACCAAACCC TAACATCGAT GTCACCAAGA TGTGTGACAG AGTCCAAGAG	180
ATTGCACTTA ATCTCATCAA GATTTGTGGT CTAGCCGAAG GTCACCTAGA AAACCATTTC	240
TCTTCGATCT TGACCTCTTA CCAAGACAAC CCACTTCATC ATTTAAACAT TTTCCCTTAT	300
TACAACAAC TTTTGAAACT CGGAAAGCTC GAGTTCGACC TCCTCGAACA AAACCTAAAT	360

GGCTTTGTCC CAAAGAGTGT GGCTTTCATT GGATCTGGTC CTCTTCCTCT CACTTCCATC	420
GTTCTTGCTT CATTCCATCT CAAAGACACA ATCTTTCACA ACTTTGACAT CGACCCATCA	480
GCGAACTCAC TCGCTTCTCT TCTGGTTTCC TCTGATCCAG ACATCTCTCA ACGCATGTTC	540
TTCCACACCG TTGATATAAT GGACGTGACA GAGAGCTTAA AGAGCTTTGA TGTCGTGTTT	600
CTAGCTGCTC TTGTTGGAAT GAACAAAGAG GAGAAAGTTA AAGTGATCGA GCATCTGCAG	660
AAACACATGG CTCCTGGTGC TGTGCTCATG CTTAGGAGTG CTCATGGTCC GAGAGCGTTT	720
CTTTATCCGA TCGTTGAGCC GTGTGATCTT CAGGGGTTCC AGGTTTTGTC TATTTATCAC	780
CCAACAGATG ATGTTATCAA CTCCGTGGTG ATCTCTAAAA AGCATCCAGT TGTTTCAATT	840
GGGAATGTTG GTGGTCCTAA TTCATGCTTG CTCAAGCCTT GCAACTGTTC CAAGACCCAC	900
GCGAAAATGA ACAAGAACAT GATGATCGAG GAGTTCGGAG CTAGGGAGGA ACAGTTGTCT	960
TAA	963

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、ムギネ酸類の生合成経路を示すものである。

【図 2】

図 2 は、鉄欠乏オオムギ及び対照のオオムギの根からの精製過程での両者の比較を示すものである。

【図 3】

図 3 は、30～35 kDa 付近の分取 SDS-PAGE を示す。横棒は各ゲル片から検出された酵素活性を相対表示したもの。

【図 4】

図 4 は、ゲルろ過カラムからのニコチアナミン合成酵素活性の溶出パターン。黒丸は酵素活性を示す。

【図 5】

図 5 は、オオムギ由来のニコチアナミン合成酵素から決定した 6 つの部分アミノ酸配列と、コンピューター検索により得られたイネの類似の配列とを比較したものである。一致するアミノ酸残基を「:」で示した。

【図 6】

図 6 は、NAS1 の cDNA の全長とそこから予想されるアミノ酸配列を示したものである。下線で示した部分は、前記図 5 の部分配列と一致している部分を示している。その右側に塩基の数を示した。左側にアミノ酸残基の数を示した。

【図 7】

図 7 は、オオムギから得られた前記の 7 つの cDNA から予想されるアミノ酸配列の比較を示したものである。全てのクローンで一致するアミノ酸残基を「*」で示した。カッコ内の「*」印は NAS5-1 及び 5-2 以外のクローンで一致するアミノ酸残基を示す。下線で示した部分は前記図 5 の部分配列と一致した部分を示している。

【図 8】

図 8 は、マルトースバインディングプロテイン-NAS1 融合蛋白質を発現している大腸菌の粗抽出物のニコチアナミン合成活性を、薄層クロマトグラフィー

(TLC) で検出した結果を示すものである

【図 9】

図 9 は、NAS1 をプローブとしたノーザンハイブリダイゼーション解析を示す。

【図 10】

図 10 は、nas1 をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析を示す。

【図 11】

図 11 は、活性検出に用いた粗酵素試料のウエスタンブロット解析を示す。

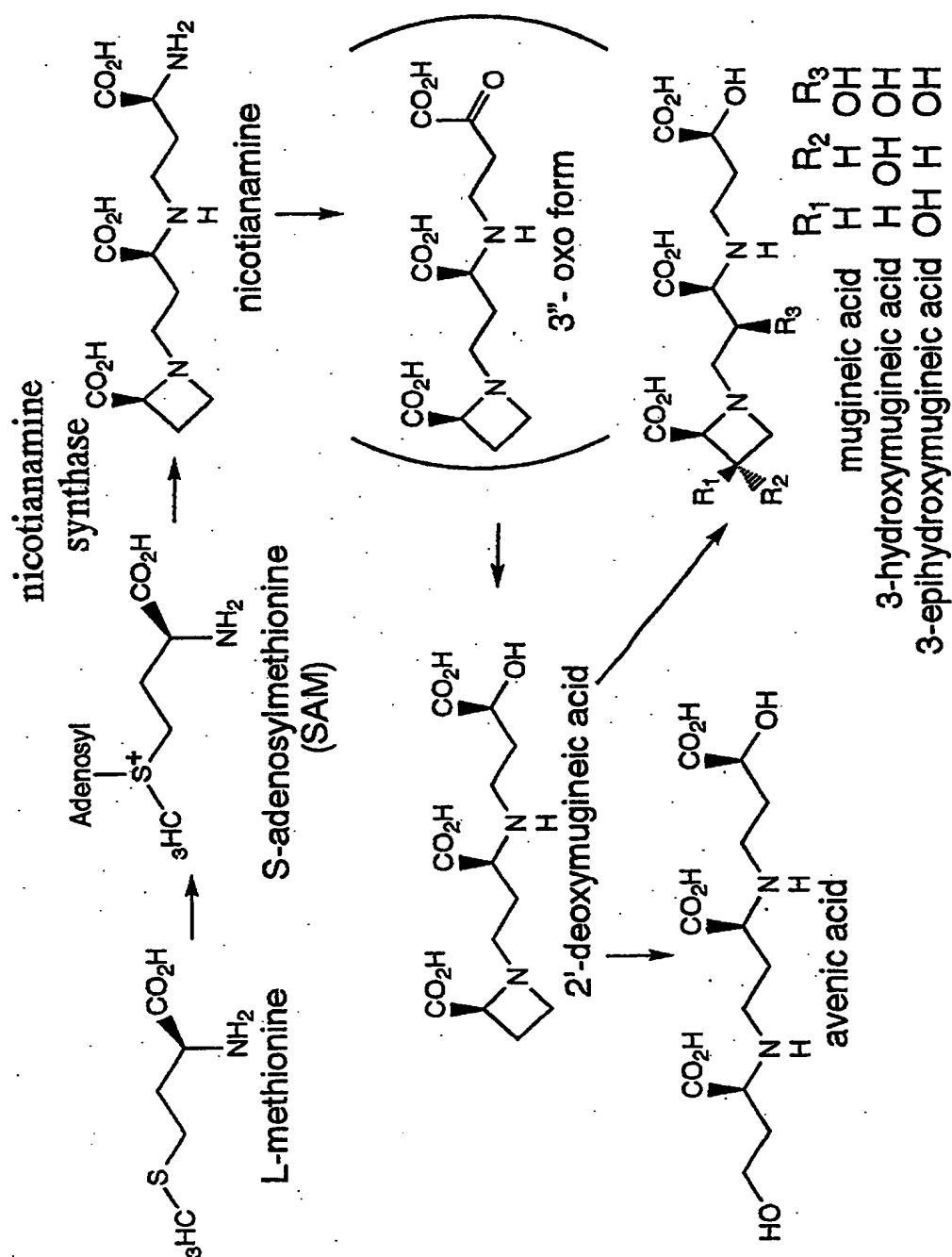
【図 12】

図 12 は、トリクロロ酢酸／アセトンで抽出した全タンパク質のウエスタンブロット解析を示す。

【書類名】

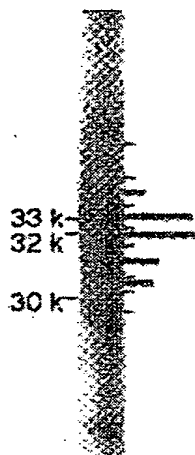
【図 1】

図面

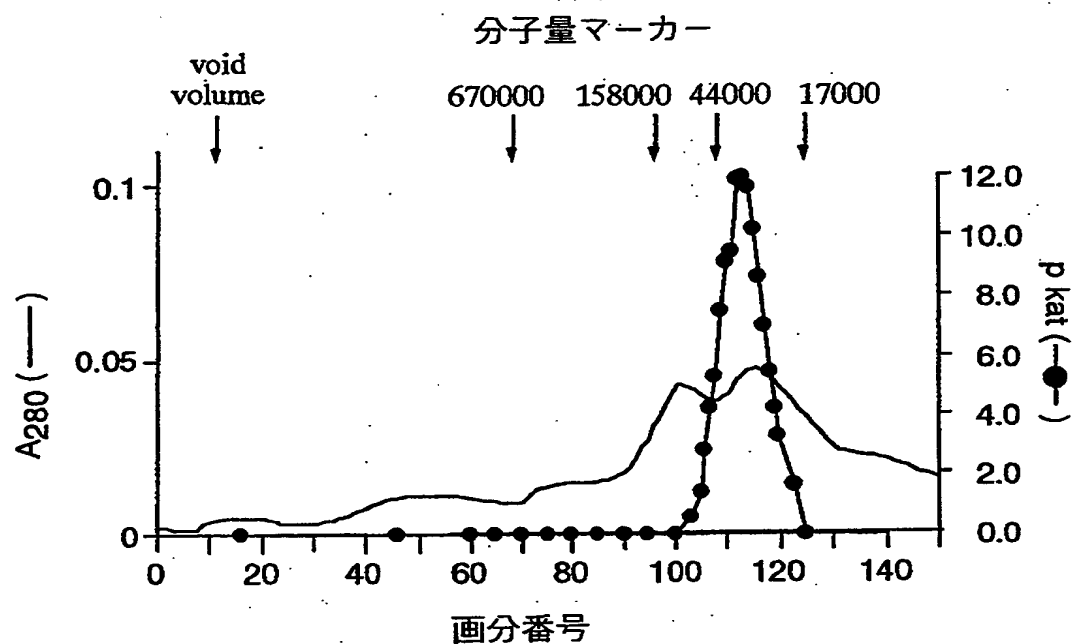


【図 3】

図面代用写真

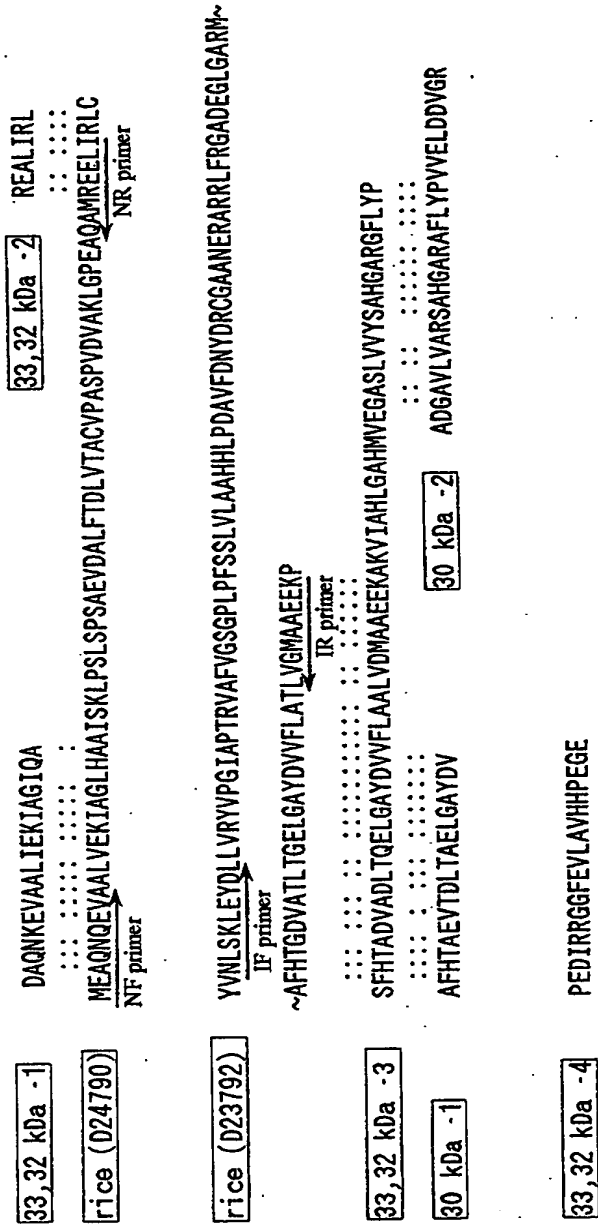


【図4】



【図5】

図面に代える写真



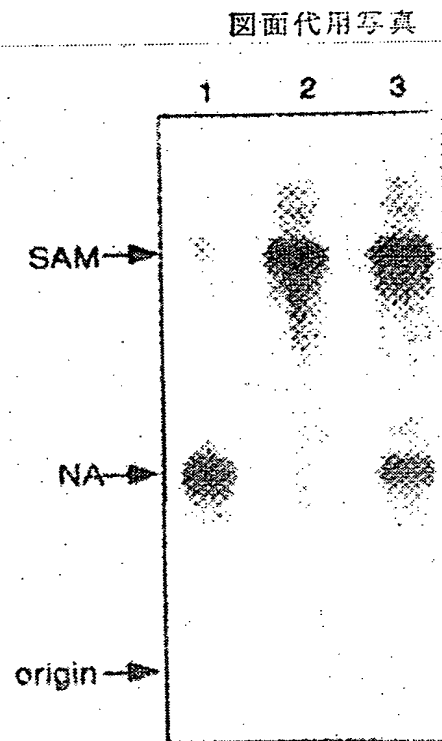
【図6】

図面に代える写真

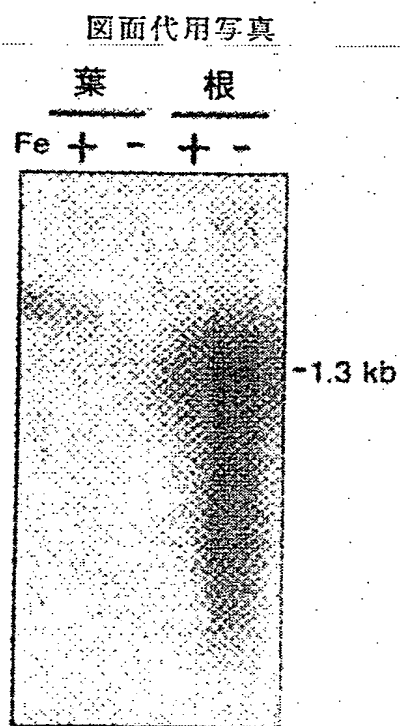
	GCG	TTC	AGA	GGC	TTC	CAG	AGT	TCT	TCC	GGT	CAC	CAA	GAA	GCA	TTT	GAT	CAT	AAC	54
19	ATG	GAT	GCC	CAG	AAC	AAG	GAG	GTC	GCT	GCT	CTG	ATC	GAG	AAG	ATC	GCC	GGT	ATC	108
	<u>M</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>Q</u>	<u>N</u>	<u>K</u>	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>E</u>	<u>K</u>	<u>I</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>I</u>	
37	CAG	GCC	GCC	ATC	GCC	GAG	CTG	CCG	TCG	CTG	AGC	CCG	TCC	CCC	GAG	GTC	GAC	AGG	162
	<u>Q</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>I</u>	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>D</u>	<u>R</u>	
55	CTC	TTC	ACC	GAC	CTC	GTC	ACG	GCC	TGC	GTC	CCG	CCG	AGC	CCC	GTC	GAC	GTG	ACG	216
	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>V</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	<u>V</u>	<u>D</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	
73	AAG	CTC	AGC	CCG	GAG	CAC	CAG	AGG	ATG	CGG	GAG	GCT	CTC	ATC	CGC	TTG	TGC	TCC	270
	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	<u>E</u>	<u>H</u>	<u>Q</u>	<u>R</u>	<u>M</u>	<u>R</u>	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>R</u>	<u>L</u>	<u>C</u>	<u>S</u>	
91	GCC	GCC	GAG	GGG	AAG	CTC	GAG	GCG	CAC	TAC	GCC	GAC	CTG	CTC	GCC	ACC	TTC	GAC	324
	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>G</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>H</u>	<u>Y</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>F</u>	<u>D</u>	
109	AAC	CCG	CTC	GAC	CAC	CTC	GGC	CTC	TTC	CCG	TAC	TAC	AGC	AAC	TAC	GTC	AAC	CTC	378
	<u>N</u>	<u>P</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	<u>H</u>	<u>L</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>P</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>Y</u>	<u>V</u>	<u>N</u>	<u>L</u>	
127	AGC	AGG	CTG	GAG	TAC	GAG	CTC	CTG	GCG	CGC	CAC	GTG	CCG	GGC	ATC	GCG	CCG	GCG	432
	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>L</u>	<u>E</u>	<u>Y</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>R</u>	<u>H</u>	<u>V</u>	<u>P</u>	<u>G</u>	<u>I</u>	<u>A</u>	<u>P</u>	<u>A</u>	
145	CGC	GTC	GCC	TTC	GTC	GGC	TCC	GGC	CCG	CTG	CCG	TTC	AGC	TCG	CTC	GTC	CTC	GCC	486
	<u>R</u>	<u>V</u>	<u>A</u>	<u>F</u>	<u>V</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>P</u>	<u>L</u>	<u>P</u>	<u>F</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	
163	GCG	CAC	CAC	CTG	CCC	GAG	ACC	CAG	TTC	GAC	AAC	TAC	GAC	CTG	TGC	GGC	GCG	GCC	540
	<u>A</u>	<u>H</u>	<u>H</u>	<u>L</u>	<u>P</u>	<u>E</u>	<u>T</u>	<u>Q</u>	<u>F</u>	<u>D</u>	<u>N</u>	<u>Y</u>	<u>D</u>	<u>L</u>	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	
181	AAC	GAG	CGC	GCC	AGG	AAG	CTG	TTC	GGC	GCG	ACG	GCG	GAC	GGC	GTC	GGC	GCG	CGT	594
	<u>N</u>	<u>E</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>R</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>V</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>R</u>	
199	ATG	TCG	TTC	CAC	ACG	GCG	GAC	GTC	GCC	GAC	CTC	ACC	CAG	GAG	CTC	GGC	GCC	TAC	648
	<u>M</u>	<u>S</u>	<u>F</u>	<u>H</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>V</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>Q</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>Y</u>	
217	GAC	GTG	GTC	TTC	CTC	GCC	GCG	CTC	GTC	GGC	ATG	GCA	GCC	GAG	GAG	AAG	GCC	AAG	702
	<u>D</u>	<u>V</u>	<u>V</u>	<u>F</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>G</u>	<u>M</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>K</u>	
235	GTG	ATT	GCC	CAC	CTG	GGC	GCG	CAC	ATG	GTG	GAG	GGG	GCG	TCC	CTG	GTC	GTG	CGG	756
	<u>V</u>	<u>I</u>	<u>A</u>	<u>H</u>	<u>L</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>H</u>	<u>M</u>	<u>V</u>	<u>E</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>V</u>	<u>R</u>	
253	AGC	GCA	CGG	CCC	CGC	GGC	TTT	CTT	TAC	CCC	ATT	GTG	GAC	CCG	GAG	GAC	ATC	AGG	810
	<u>S</u>	<u>A</u>	<u>R</u>	<u>P</u>	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>F</u>	<u>L</u>	<u>Y</u>	<u>P</u>	<u>I</u>	<u>V</u>	<u>D</u>	<u>P</u>	<u>E</u>	<u>D</u>	<u>I</u>	<u>R</u>	
271	CGG	GGT	GGG	TTC	GAG	GTG	CTG	GCC	GTG	CAC	CAC	CCG	GAA	GGT	GAG	GTG	ATC	AAC	864
	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>F</u>	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>H</u>	<u>H</u>	<u>P</u>	<u>E</u>	<u>G</u>	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>I</u>	<u>N</u>	
289	TCT	GTC	ATC	GTC	GCC	CGT	AAG	GCC	GTC	GAA	GCG	CAG	CTC	AGT	GGG	CCG	CAG	AAC	918
	<u>S</u>	<u>V</u>	<u>I</u>	<u>V</u>	<u>A</u>	<u>R</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>Q</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>P</u>	<u>Q</u>	<u>N</u>	
307	GGA	GAC	GCG	CAC	GCA	CGG	GGC	GCG	GTG	CCG	TTG	GTC	AGC	CCG	CCA	TGC	AAC	TTC	972
	<u>G</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>H</u>	<u>A</u>	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>P</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>C</u>	<u>N</u>	<u>F</u>	
325	TCC	ACC	AAG	ATG	GAG	GCG	AGC	GCG	CTT	GAG	AAG	AGC	GAG	GAG	CTG	ACC	GCC	AAA	1026
	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>K</u>	<u>M</u>	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>E</u>	<u>K</u>	<u>S</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>K</u>	
	GAG	CTG	GCC	TTT	TGA	TTG	AAG	AGT	GCG	CGT	GGT	CAT	TCT	GTC	GCC	TGC	GAT	CGT	1080
	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>F</u>	<u>*</u>														
	GGT	AAC	TTT	CCT	ACT	CGT	GTG	TGT	TTT	GAT	GTT	TGT	GCC	TGT	AAG	AGT	TAT	GCT	1134
	TCG	GGC	CTT	GTG	CTG	TTA	ATT	TAC	ACG	CGT	TAC	ATG	TAG	TAC	TTG	TAT	TTA	TAC	1188
	CTG	GAA	TAA	CGG	TAT	GTG	ACA	TAA	ATA	TTA	GTG	GGA	TTT	GAA	GTG	TAA	TGC	TAA	1242
	ATA	ATA	AGA	AAA	CTT	GAT	GCA	GAC	ATT	CAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AA	

NAS 1	1	MDAQN--KEV	AALIEKIAGI	QAAIAELPSL	SPSPEVDRLF	TDLVTACVPP	50
NAS 2	1	MAAQNN-QEV	DALVEKITGL	HAAIAKLPSL	SPSPDVALF	TELVTACVPP	50
NAS 3	1	MAAQNNKDV	AALVEKITGL	HAAIAKLPSL	SPSPDVALF	TELVTACVPP	50
NAS 4	1	MDGQSE--EV	DALVQKITGL	HAAIAKLPSL	SPSPDVALF	TDLVTACVPP	50
NAS 5-1	1	MEAENG--EV	AALVEKITGL	HAAISKLPAL	SPSPQVDALF	TELVAACVPS	50
NAS 5-2	1	MEAENG--EV	AALVEKITGL	HAAISKLPAL	SPSPQVDALF	TELVAACVPS	50
NAS 6	1	MDAQN--KEV	DALVQKITGL	HAAIAKLPSL	SPSPDVALF	TDLVTACVPP	50
		*	*	**	**	*	*
NAS 1	51	SPVDVTKLSP	EHQRMREALI	RLCSAAEGKL	EAHYADLLAT	FDNPLDHLGL	100
NAS 2	51	SPVDVTKLGP	EAQEMREGLI	RLCSEAEGKL	EAHYSMDLAA	FDKPLDHLGM	100
NAS 3	51	SPVDVTKLGP	EAQEMREGLI	RLCSEAEGKL	EAHYSMDLAA	FDNPLDHLGM	100
NAS 4	51	SPVDVTKLAP	EAQEMREGLI	RLCSEAEGKL	EAHYSMDLAA	FDNPLDHLGM	100
NAS 5-1	51	SPVDVTKLGP	EAQEMRODLI	RLCSAAEGLL	EAHYSMDLTA	LDSPLDHLGR	100
NAS 5-2	51	SPVDVTKLGP	EAQEMRODLI	RLCSAAEGLL	EAHYSMDLTA	LDSPLDHLGR	100
NAS 6	51	SPVDVTKLGS	EAQEMREGLI	RLCSEAEGKL	EAHYSMDLAA	FDNPLDHLGM	100
		*****	* * * *	*****	*****	* * *	*****
NAS 1	101	FPYYSNYVNL	SRLEYELLAR	HVPG-IAPAR	VAFVGGSGPLP	FSSLVLAHH	150
NAS 2	101	FPYNNYINL	SKLEYELLAR	YVPGGYRPAR	VAFIGSGPLP	FSSFVLAARH	150
NAS 3	101	FPYYSNYINL	SKLEYELLAR	YVRR-HRPAR	VAFIGSGPLP	FSSFVLAARH	150
NAS 4	101	FPYYSNYINL	SKLEYELLAR	YVGRHRPAR	VAFIGSGPLP	FSSFVLAARH	150
NAS 5-1	101	FPYFDNYVNL	SKLEHLLAG	HW-----	-----	FSSFLATYH	150
NAS 5-2	101	FPYFDNYVNL	SKLEHLLAG	HW----	AAPAR	VAFIGSGPLP	150
NAS 6	101	FPYYSNYINL	SKLEYELLAR	YVPGGIARPA	VAFIGSGPLP	FSSFVLAARH	150
		***	** *	****	***	(*** *****)	*** ** *
NAS 1	151	LPETQFDNYD	LCGAANERAR	KLFGATADGV	GARMSFHTAD	VADLTQELGA	200
NAS 2	151	LPDTMFNDNY	LCGAANDRAS	KLFRADRD-V	GARMSFHTAD	VADLAGELAK	200
NAS 3	151	LPDTMFNDNY	LCGAANDRAS	KLFRADTD-V	GARMSFHTAD	VADLAGELAK	200
NAS 4	151	LPDTVFNDNY	LCGAANDRAS	RLFRADKD-V	GARMSFHTAD	VADLTDELAT	200
NAS 5-1	151	LPDTRFDNYD	RCSVANGRAM	KLVGAADEGV	RSRMAFHTAE	VTDLTAEALGA	200
NAS 5-2	151	LPDTRFDNYD	RCSVANGRAM	KLVGAADEGV	RSRMAFHTAE	VTDLTAEALGA	200
NAS 6	151	LPDAMFDNYD	LCGAANDRAS	KLFRADKD-V	GARMSFHTAD	VADLTRELAA	200
		**	*****	* * *	* * *	**	** *
NAS 1	201	YDVVFLAALV	GMAAEKAKV	IAHLGAHMVE	GASLVVRSAR	P-RGFLYPV	250
NAS 2	201	YDVVFLAALV	GMAAEKAKV	IAHLGAHMAD	GAALVVRSAH	GARGFLYPV	250
NAS 3	201	YDVVFLAALV	GMAAEKAKV	IAHLGAHMAD	GAALVVRSAH	GARGFLYPV	250
NAS 4	201	YDVVFLAALV	GMAAEKAKV	IAHLGAHMAD	GAALVAR--H	GARGFLYPV	250
NAS 5-1	201	YDVVFLAALV	GMSKEKADA	IAHLGKHMAD	GAALVARSAR	GARGFLYPV	250
NAS 5-2	201	YDVVFLAALV	GMSKEKADA	IAHLGKHMAD	GAALVARSAR	GARGFLYPV	250
NAS 6	201	YDVVFLAALV	GMAAEKAKV	IPHLGAHMAD	GAALVVRSA-	QARGFLYPV	250
		*****	**	**	* ** *	** *	* **** *
NAS 1	251	DPDIDIRGGF	EVLAVHHP-E	GEVINSVIVA	RKAVEAQLSG	PQNGD----	300
NAS 2	251	DPQIDIRGGF	EVLAVCHPD-	DDVNSVIAA	QKSKDVHADG	LGSGRGAGGQ	300
NAS 3	251	DPQIDIRGGF	EVLAVCHPD-	DDVNSVIAA	QKSKEVHADG	LGSARGAGRQ	300
NAS 4	251	DPQIDIRGGF	EVLAVCHPD-	DDVNSVIAA	QKSNDVHEYG	LGSGRG-GR-	300
NAS 5-1	251	ELDDVGRGGF	QVLAVHHPAG	DEVFNSFIVA	RKVMSA		
NAS 5-2	251	ELDDVGRGGF	QVLAVHHPAG	DEVFNSFIVA	RKVMSA		
NAS 6	251	DPQIDIRGGF	EVLAVCHPD-	DDVNSVIAA	HKSKDVHANE	RPNGRG-G-Q	300
		*	****	****	**	*	*
NAS 1	301	HARGA-VPLV	SPPCNFSTKM	EASALE--KS	EELTAKELAF		
NAS 2	301	YARGT-VPV	SPPCRFGE-M	VADVTQNHKR	DEFANAEEVAF		
NAS 3	301	YARGT-VPV	SPPCRFGE-M	VADVTQNHKR	DEFANAEEVAF		
NAS 4	301	YARGT-VPV	SPPCRFGE-M	VADVTQ--KR	EEFANAEEVAF		
NAS 5-1							
NAS 5-2							
NAS 6	301	Y-RGA-VPV	SPPCRFGE-M	VADVT--HKR	EEFTNAEEVAF		

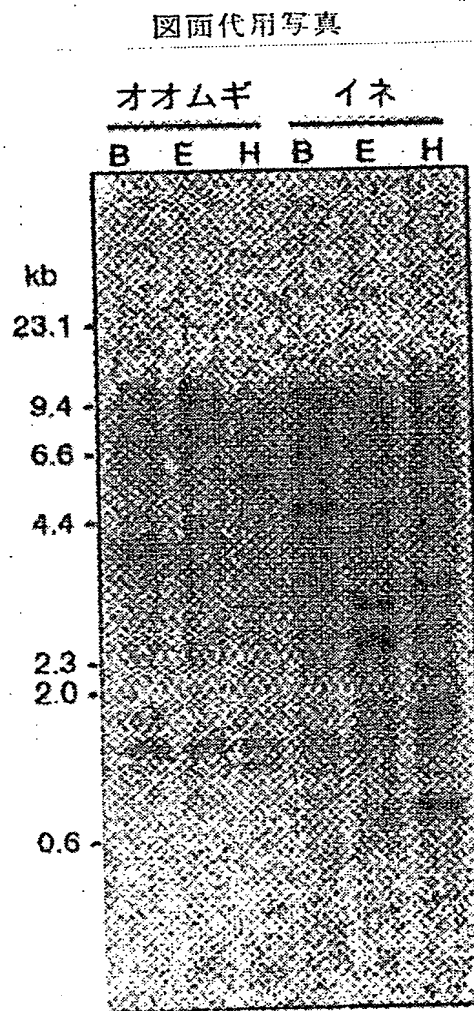
【図 8】



【図9】

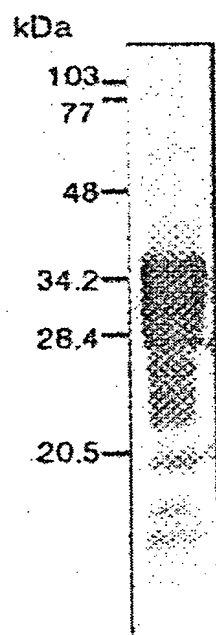


【図 10】



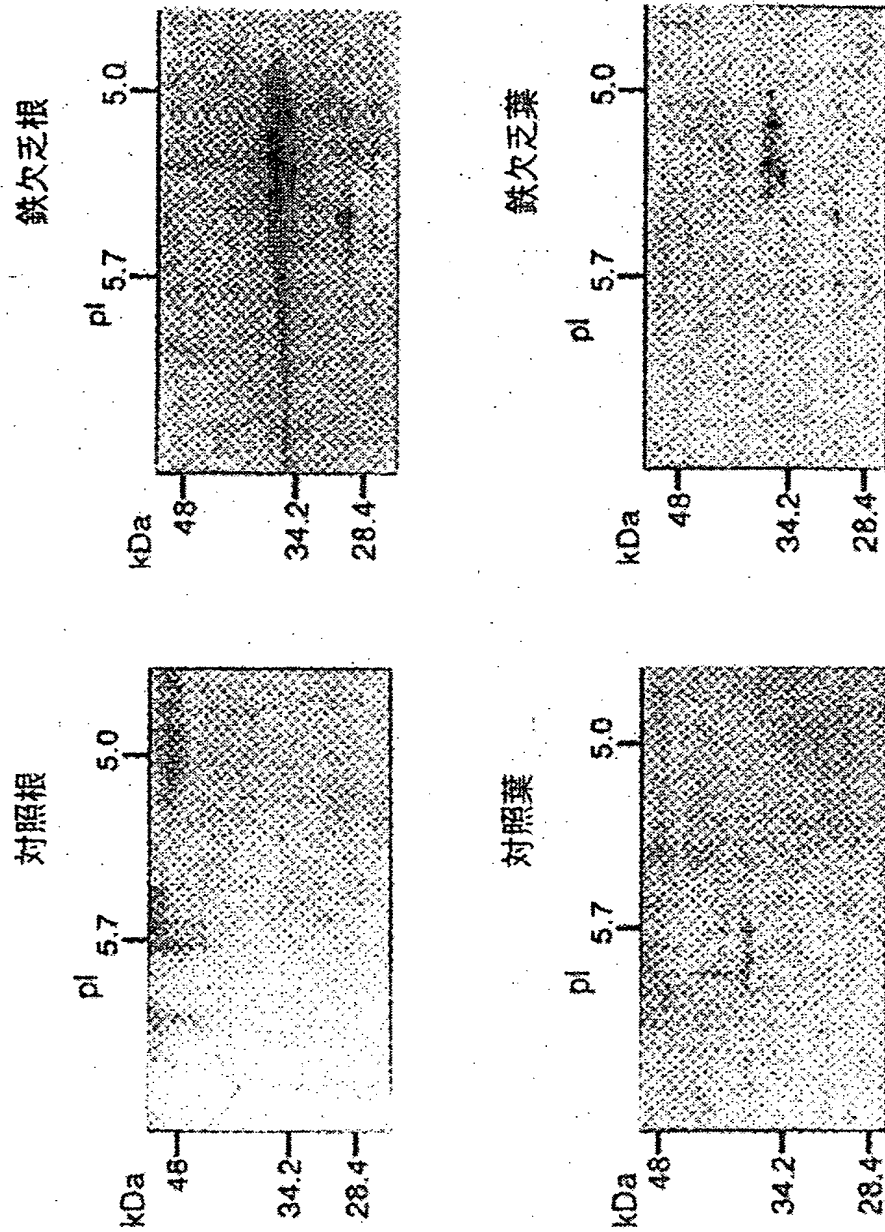
【図 1 1】

図面代用写真



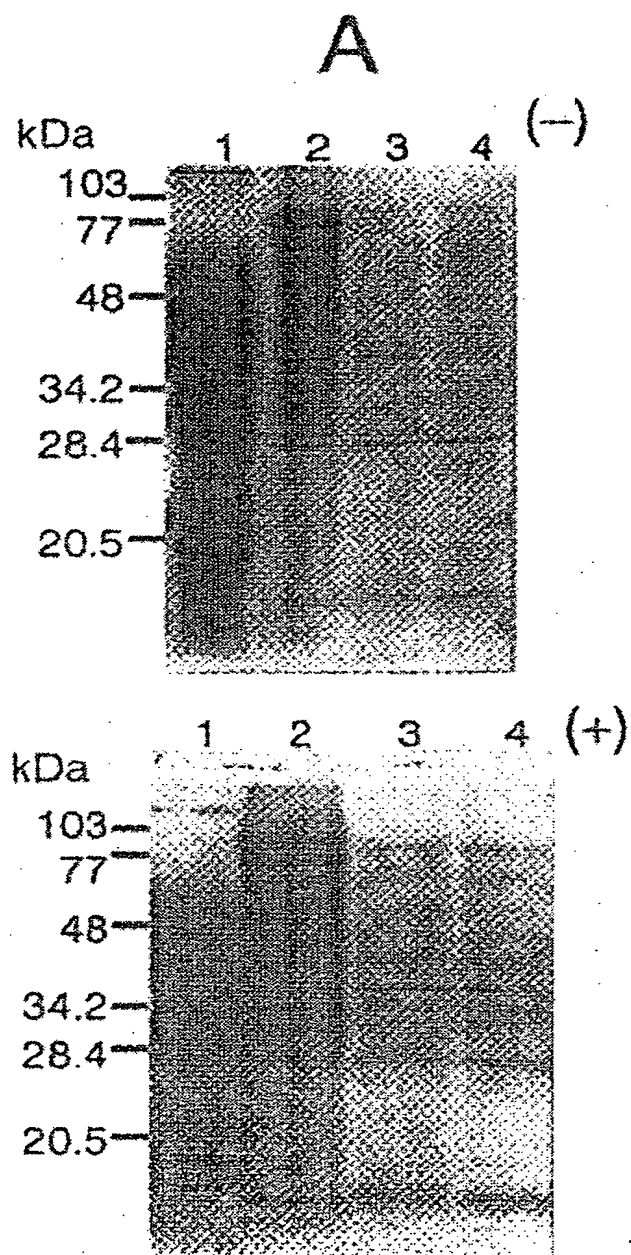
【図12】

図面代用写真



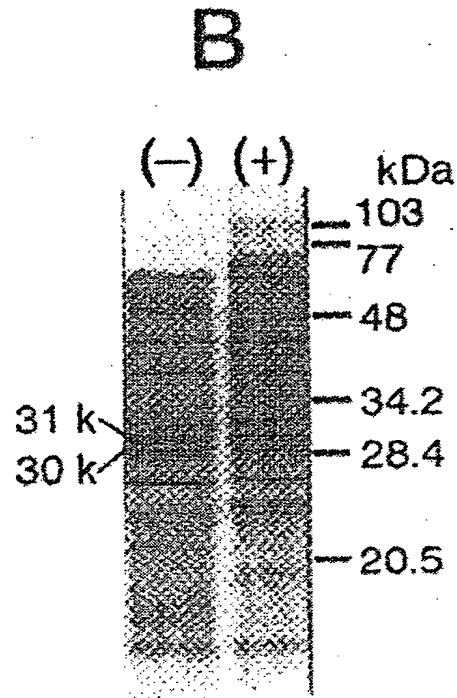
【図2】

図面代用写真



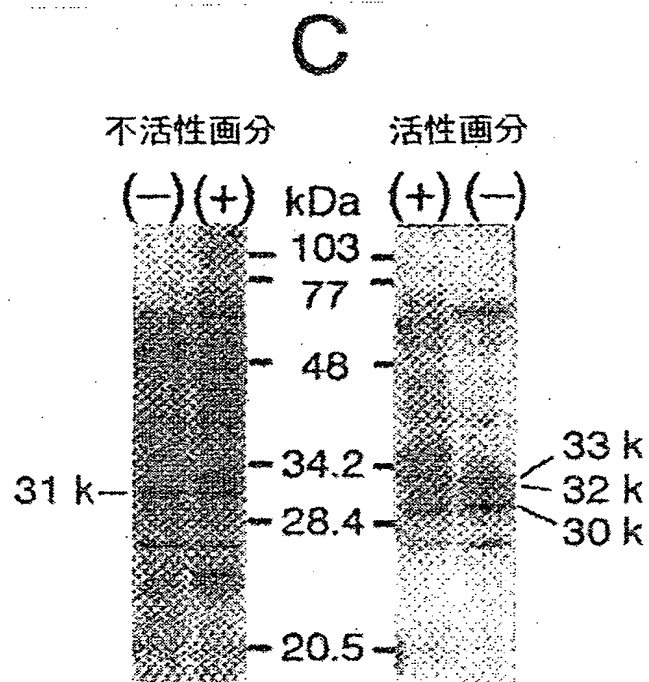
【図 2】

図面代用写真



【図2】

図面代用写真



【書類名】 要約書

1 / 1

【要約】

【課題】 本発明は、ニコチアナミン合成酵素を精製単離し、この遺伝子をクローニングし、その塩基配列及びアミノ酸配列を決定し、この遺伝子を用いて鉄欠乏に対する耐性の強い植物、特にイネ科植物を提供することを目的とするものである。

【解決手段】 本発明は、ムギネ酸の生合成経路におけるニコチアナミン合成酵素、そのアミノ酸配列、それをコードする遺伝子、当該遺伝子を含有するベクター、当該ベクターで形質転換された細胞、それを用いたニコチアナミンの製造方法、ニコチアナミン合成酵素をコードする遺伝子で形質転換された植物、及び、ニコチアナミン合成酵素に対する抗体に関する。

【選択図】 なし

委 任 状

平成 10 年 4 月 1 日

私儀 識別番号100102668 弁理士 佐 伯 憲 生 氏
を代理人として次の事項を委任します。

発明の名称「ニコチアミン合成酵素、それをコードする遺伝子」

- 1、特許出願に関する一切の件並びに本件に関する放棄若しくは取下げ、出願変更及び拒絶査定に対する審判の請求並びにその取下げ。
- 2、上記出願に基づく特許法第41条第1項及び実用新案法第8条第1項の優先権主張並びにその取下げ及び優先権主張に伴う後の出願に関する一切の件。
- 3、上記出願の分割出願に関する上記事項一切。
- 4、上記出願に関する審査請求、優先審査に関する事情説明書の提出、刊行物の提出、証明の請求及び上記出願又は審判請求に関する物件の下附を受ける事項。
- 5、第1項に関する通常実施権許諾の裁定請求、裁定取消請求並びにそれ等に対する答弁、取下げその他本件に関する提出書類及び物件の下附を受ける事項。
- 6、上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続に関する事項。
- 7、上記事項を処理するため、復代理人を選任及び解任する事項。

識別番号 396020800

埼玉県川口市本町四丁目1番8号

科学技術振興事業団

理事長 中 村 守 孝



【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】
【識別番号】 396020800
【住所又は居所】 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
【氏名又は名称】 科学技術振興事業団
【代理人】 申請人
【識別番号】 100102668
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋3丁目15番2号 高愛ビル9
階 たくみ特許事務所
【氏名又は名称】 佐伯 憲生
【提出された物件の記事】
【提出物件名】 委任状（代理権を証明する書面） 1

【書類名】 手続補正書

【整理番号】 PA906235

【提出日】 平成10年 7月21日

【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志 殿

【事件の表示】

【出願番号】 平成10年特許願第137685号

【発明の名称】 ニコチアナミン合成酵素、それをコードする遺伝子

【補正をする者】

【事件との関係】 特許出願人

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代表者】 理事長 中村 守孝

【代理人】

【識別番号】 100102668

【弁理士】

【氏名又は名称】 佐伯 憲生

【電話番号】 03-5205-2521

【補正により増加する請求項の数】 0

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0013

【補正方法】 変更

【補正の内容】 1

【手続補正 2】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0014

【補正方法】 変更

【補正の内容】 2

【手続補正 3】

【補正対象書類名】 明細書
【補正対象項目名】 図面の簡単な説明
【補正方法】 変更
【補正の内容】 3

【手続補正 4】

【補正対象書類名】 図面
【補正対象項目名】 全図
【補正方法】 変更
【補正の内容】 5

【0013】

対照の酵素活性は鉄欠乏の1/4であった。

本発明の酵素を精製する各段階の活性画分のペプチド組成をSDS-PAGEで比較したものを、図2、図13、及び、図14に示す。図2、図13、及び、図14は、鉄欠乏のオオムギの根200gからの精製過程（図中（-）で示す）と、対照のオオムギの根200gからの精製過程（図中（+）で示す）との比較を示す。SDS-PAGEは、12.5%アクリルアミドスラブゲル（Laemmli, 1970）で行った。ゲルは、クマシーブリリアンドブルーで染色した。図2は、DEAEセファロースの前の段階のもので、上段は鉄欠乏のオオムギの根からのものを示し、下段は対照の根からのものを示す。各レーンの、レーン1は粗抽出物200 μ gのものを、レーン2はブチルトヨパール650M後のもの100 μ gのものを、レーン3はヒドロキシルアパタイト後のもの20 μ gのものを、レーン4はブチルトヨパール650M後のもの15 μ gのものを示している。図13は、DEAEセファロースFF後のもので、各レーン25 μ gのものである。図14は、エーテルルトヨパール650M後のもので、左側は不活性分画を、右側は活性分画を示し、各画分の1/25を泳動させたものである。

【0014】

この結果から、DEAEセファロースの前の段階までは鉄欠乏、および対照とでほとんど違いは見られなかった（図2参照）。DEAEセファロース後、30および31 kDaのペプチドが鉄欠乏で誘導されていることがわかった（図13参照）。エーテルトヨパール後、31 kDa ペプチドは活性画分から除かれた。新たに32および33 kDaのペプチドが鉄欠乏で誘導されていることがわかる（図14参照）。32および33 kDa ペプチドからは活性が検出されたが、30 kDa ペプチドからは検出されなかった（図3参照）。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、ムギネ酸類の生合成経路を示すものである。

【図2】

図2は、鉄欠乏オオムギ及び対照のオオムギの根からの精製過程での両者の比較を示すものである。

【図3】

図3は、30～35kDa付近の分取SDS-PAGEを示す。横棒は各ゲル片から検出された酵素活性を相対表示したもの。

【図4】

図4は、ゲルろ過カラムからのニコチアナミン合成酵素活性の溶出パターン。黒丸は酵素活性を示す。

【図5】

図5は、オオムギ由来のニコチアナミン合成酵素から決定した6つの部分アミノ酸配列と、コンピューター検索により得られたイネの類似の配列とを比較したものである。一致するアミノ酸残基を「:」で示した。

【図6】

図6は、NAS1のcDNAの全長とそこから予想されるアミノ酸配列を示したものである。下線で示した部分は、前記図5の部分配列と一致している部分を示している。その右側に塩基の数を示した。左側にアミノ酸残基の数を示した。

【図7】

図7は、オオムギから得られた前記の7つのcDNAから予想されるアミノ酸配列の比較を示したものである。全てのクローンで一致するアミノ酸残基を「*」で示した。カッコ内の「*」印はNAS5-1及び5-2以外のクローンで一致するアミノ酸残基を示す。下線で示した部分は前記図5の部分配列と一致した部分を示している。

【図8】

図8は、マルトースバインディングプロテイン-NAS1融合蛋白質を発現している大腸菌の粗抽出物のニコチアナミン合成活性を、薄層クロマトグラフィー

(TLC)で検出した結果を示すものである

【図9】

図9は、NAS1をプローブとしたノーザンハイブリダイゼーション解析を示す。

【図10】

図10は、nas1をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析を示す。

【図11】

図11は、活性検出に用いた粗酵素試料のウエスタンブロット解析を示す。

【図12】

図12は、トリクロロ酢酸／アセトンで抽出した全タンパク質のウエスタンブロット解析を示す。

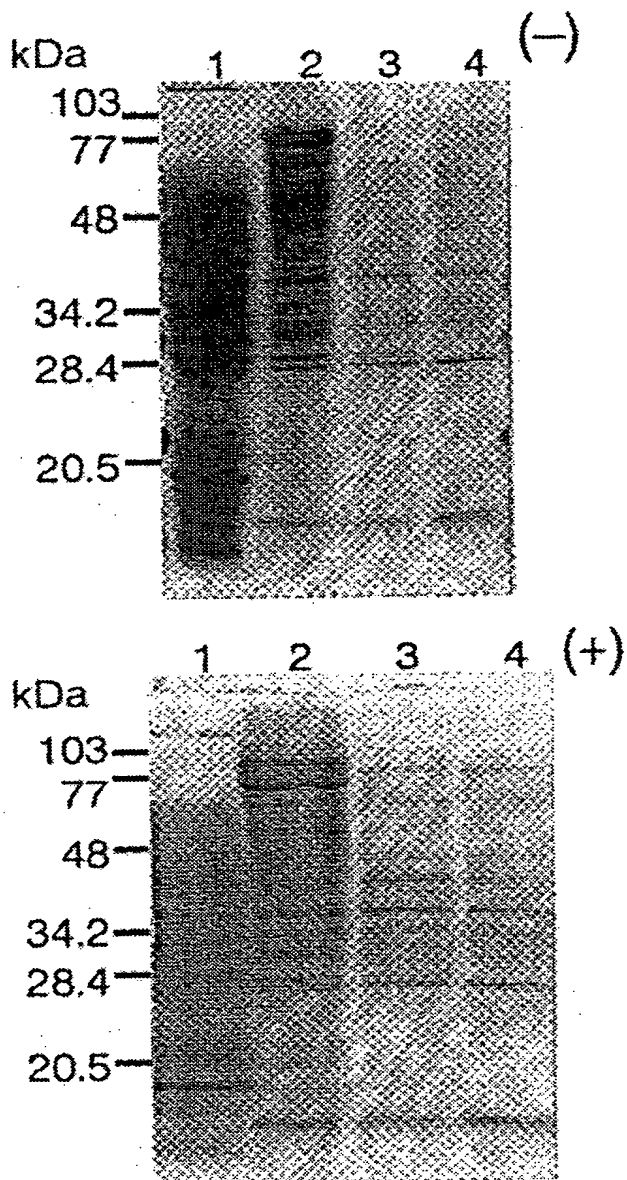
【図13】

図13は、鉄欠乏オオムギ及び対照のオオムギの根からの精製過程におけるDEAEセファロースFF後での両者の比較を示すものである。

【図14】

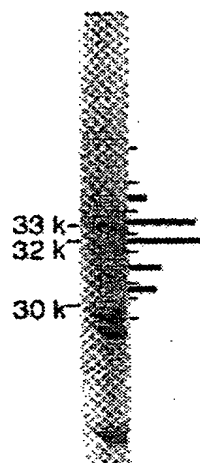
図14は、鉄欠乏オオムギ及び対照のオオムギの根からの精製過程におけるエーテルトヨパール650M後での両者の比較を示すものである。

【図2】



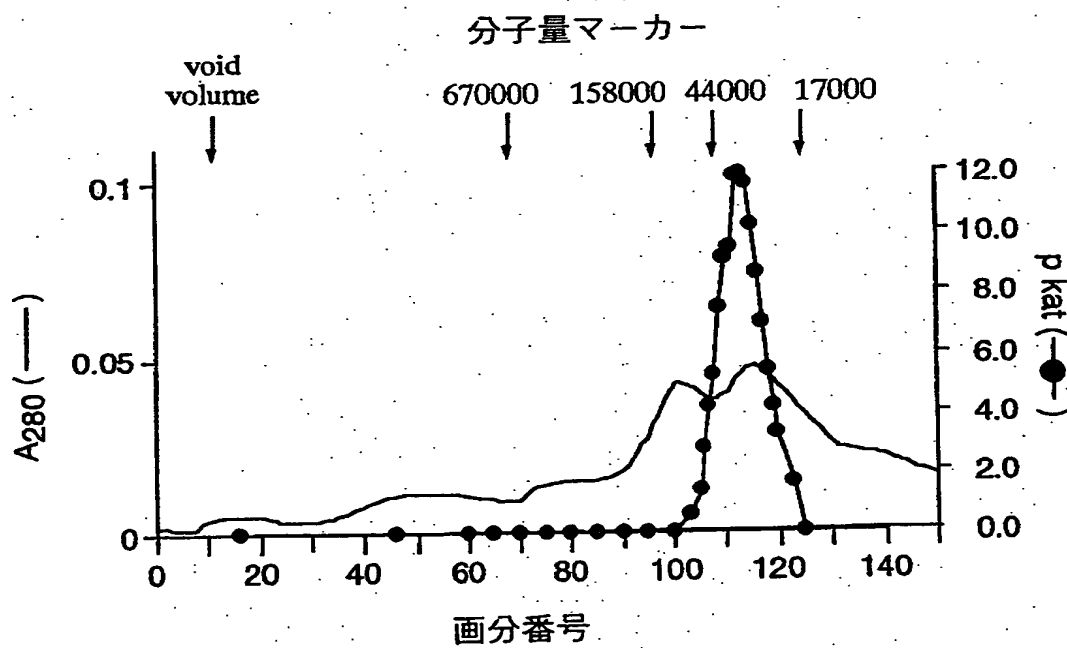
図面代用写真

【図 3】

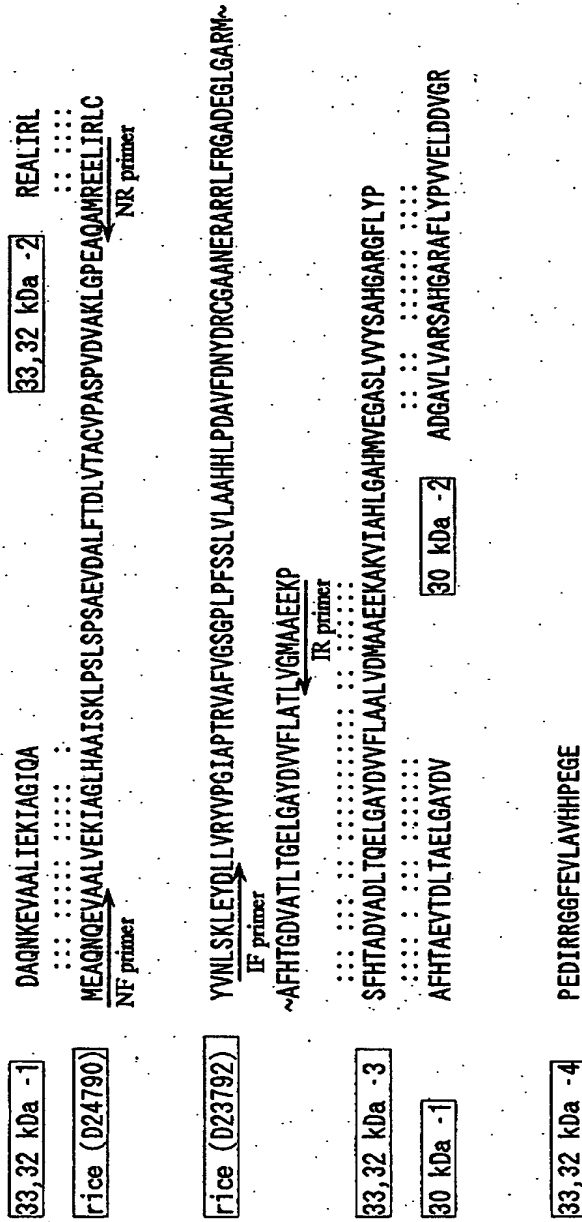


図面代用写真

【図 4】



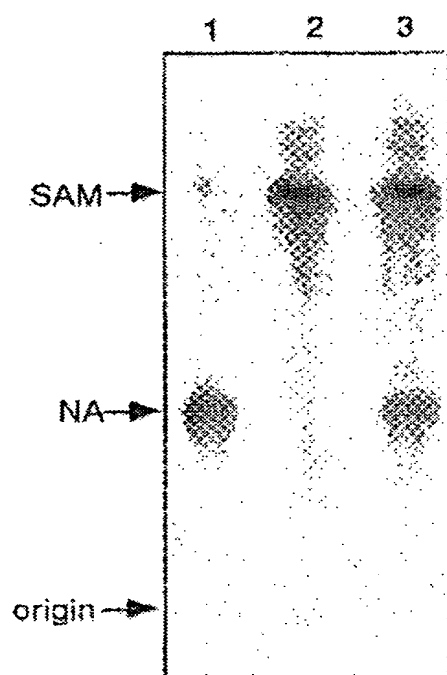
【図 5】



【図6】

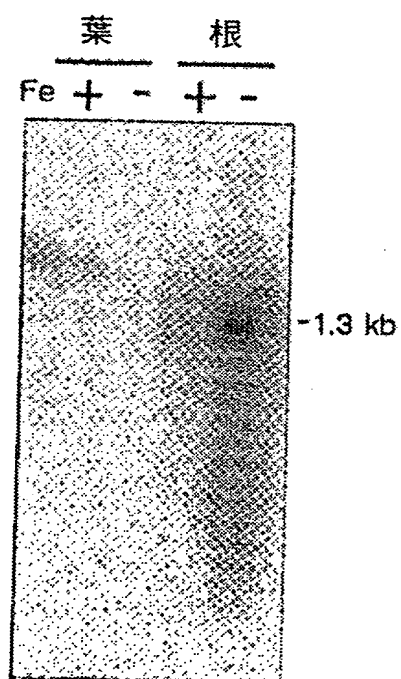
	GCG	TTC	AGA	GGC	TTC	CAG	AGT	TCT	TCC	GGT	CAC	CAA	GAA	GCA	TTT	GAT	CAT	AAC	54
19	ATG	GAT	GCC	CAG	AAC	AAG	GAG	GTC	GCT	GCT	CTG	ATC	GAG	AAG	ATC	GCC	GGT	ATC	108
	<u>M</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>Q</u>	<u>N</u>	<u>K</u>	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>E</u>	<u>K</u>	<u>I</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>I</u>	
37	CAG	GCC	GCC	ATC	GCC	GAG	CTG	CCG	TCG	CTG	AGC	CCG	TCC	CCC	GAG	GTC	GAC	AGG	162
	<u>Q</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>I</u>	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>D</u>	<u>R</u>	
55	CTC	TTC	ACC	GAC	CTC	GTC	ACG	GCC	TGC	GTC	CCG	CCG	AGC	CCC	GTC	GAC	GTG	ACG	216
	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>V</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	<u>V</u>	<u>D</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	
73	AAG	CTC	AGC	CCG	GAG	CAC	CAG	AGG	ATG	CCG	GAG	GCT	CTC	ATC	CGC	TTG	TGC	TCC	270
	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	<u>E</u>	<u>H</u>	<u>Q</u>	<u>R</u>	<u>M</u>	<u>R</u>	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>R</u>	<u>L</u>	<u>C</u>	<u>S</u>	
91	GCC	GCC	GAG	GGG	AAG	CTC	GAG	GCG	CAC	TAC	GCC	GAC	CTG	CTC	GCC	ACC	TTC	GAC	324
	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>G</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>H</u>	<u>Y</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>F</u>	<u>D</u>	
109	AAC	CCG	CTC	GAC	CAC	CTC	GGC	CTC	TTC	CCG	TAC	TAC	AGC	AAC	TAC	GTC	AAC	CTC	378
	<u>N</u>	<u>P</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	<u>H</u>	<u>L</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>P</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>Y</u>	<u>V</u>	<u>N</u>	<u>L</u>	
127	AGC	AGG	CTG	GAG	TAC	GAG	CTC	CTG	GCG	CGC	CAC	GTG	CCG	GGC	ATC	GCG	CCG	GCG	432
	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>L</u>	<u>E</u>	<u>Y</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>R</u>	<u>H</u>	<u>V</u>	<u>P</u>	<u>G</u>	<u>I</u>	<u>A</u>	<u>P</u>	<u>A</u>	
145	CGC	GTC	GCC	TTC	GTC	GGC	TCC	GGC	CCG	CTG	CCG	TTC	AGC	TCG	CTC	GTC	CTC	GCC	486
	<u>R</u>	<u>V</u>	<u>A</u>	<u>F</u>	<u>V</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>P</u>	<u>L</u>	<u>P</u>	<u>F</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	
163	GCG	CAC	CAC	CTG	CCC	GAG	ACC	CAG	TTC	GAC	AAC	TAC	GAC	CTG	TGC	GGC	GCG	GCC	540
	<u>A</u>	<u>H</u>	<u>H</u>	<u>L</u>	<u>P</u>	<u>E</u>	<u>T</u>	<u>Q</u>	<u>F</u>	<u>D</u>	<u>N</u>	<u>Y</u>	<u>D</u>	<u>L</u>	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	
181	AAC	GAG	CGC	GCC	AGG	AAG	CTG	TTC	GGC	GCG	ACG	GCG	GAC	GGC	GTC	GGC	GCG	CGT	594
	<u>N</u>	<u>E</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>R</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>V</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>R</u>	
199	ATG	TCG	TTC	CAC	ACG	GCG	GAC	GTC	GCC	GAC	CTC	ACC	CAG	GAG	CTC	GGC	GCC	TAC	648
	<u>M</u>	<u>S</u>	<u>F</u>	<u>H</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>V</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>Q</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>Y</u>	
217	GAC	GTG	GTC	TTC	CTC	GCC	GCG	CTC	GTC	GGC	ATG	GCA	GCC	GAG	GAG	AAG	GCC	AAG	702
	<u>D</u>	<u>V</u>	<u>V</u>	<u>F</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>G</u>	<u>M</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>K</u>	
235	GTG	ATT	GCC	CAC	CTG	GGC	GCG	CAC	ATG	GTG	GAG	GGG	GCG	TCC	CTG	GTC	GTG	CGG	756
	<u>V</u>	<u>I</u>	<u>A</u>	<u>H</u>	<u>L</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>H</u>	<u>M</u>	<u>V</u>	<u>E</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>V</u>	<u>R</u>	
253	AGC	GCA	CGG	CCC	CGC	GGC	TTT	CTT	TAC	CCC	ATT	GTC	GAC	CCG	GAG	GAC	ATC	AGG	810
	<u>S</u>	<u>A</u>	<u>R</u>	<u>P</u>	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>F</u>	<u>L</u>	<u>Y</u>	<u>P</u>	<u>I</u>	<u>V</u>	<u>D</u>	<u>P</u>	<u>E</u>	<u>D</u>	<u>I</u>	<u>R</u>	
271	CGG	GGT	GGG	TTC	GAG	GTG	CTG	GCC	GTG	CAC	CAC	CCG	GAA	GGT	GAG	GTG	ATC	AAC	864
	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>F</u>	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>H</u>	<u>H</u>	<u>P</u>	<u>E</u>	<u>G</u>	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>I</u>	<u>N</u>	
289	TCT	GTC	ATC	GTC	GCC	CGT	AAG	GCC	GTC	GAA	GCG	CAG	CTC	AGT	GGG	CCG	CAG	AAC	918
	<u>S</u>	<u>V</u>	<u>I</u>	<u>V</u>	<u>A</u>	<u>R</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>Q</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>P</u>	<u>Q</u>	<u>N</u>	
307	GGA	GAC	GCG	CAC	GCA	CGG	GCG	GCG	GTG	CCG	TTG	GTC	AGC	CCG	CCA	TGC	AAC	TTC	972
	<u>G</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>H</u>	<u>A</u>	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>P</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>C</u>	<u>N</u>	<u>F</u>	
325	TCC	ACC	AAG	ATG	GAG	GCG	AGC	GCG	CTT	GAG	AAG	AGC	GAG	GAG	CTG	ACC	GCC	AAA	1026
	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>K</u>	<u>M</u>	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>E</u>	<u>K</u>	<u>S</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>K</u>	
	GAG	CTG	GCC	TTT	TGA	TTG	AAG	AGT	GCG	CGT	GGT	CAT	TCT	GTC	GCC	TGC	GAT	CGT	1080
	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>F</u>	<u>*</u>														
	GGT	AAC	TTT	CCT	ACT	CGT	GTG	TGT	TTT	GAT	GTT	TGT	GCC	TGT	AAG	AGT	TAT	GCT	1134
	TCC	GGC	CTT	GTG	CTG	TTA	ATT	TAC	ACG	CGT	TAC	ATG	TAG	TAC	TTG	TAT	TTA	TAC	1188
	CTG	GAA	TAA	CGG	TAT	GTA	ACA	TAA	ATA	TTA	GTG	GGA	TTT	GAA	GTG	TAA	TGC	TAA	1242
	ATA	ATA	AGA	AAA	CTT	GAT	GCA	GAC	ATT	CAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AA	

【図8】



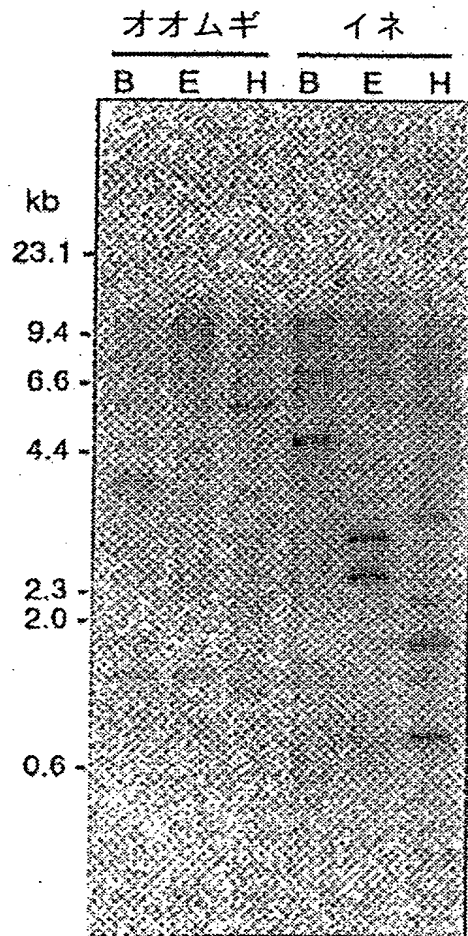
図面代用写真

【図9】



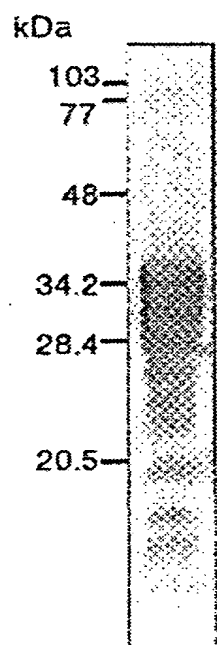
図面代用写真

【図 10】



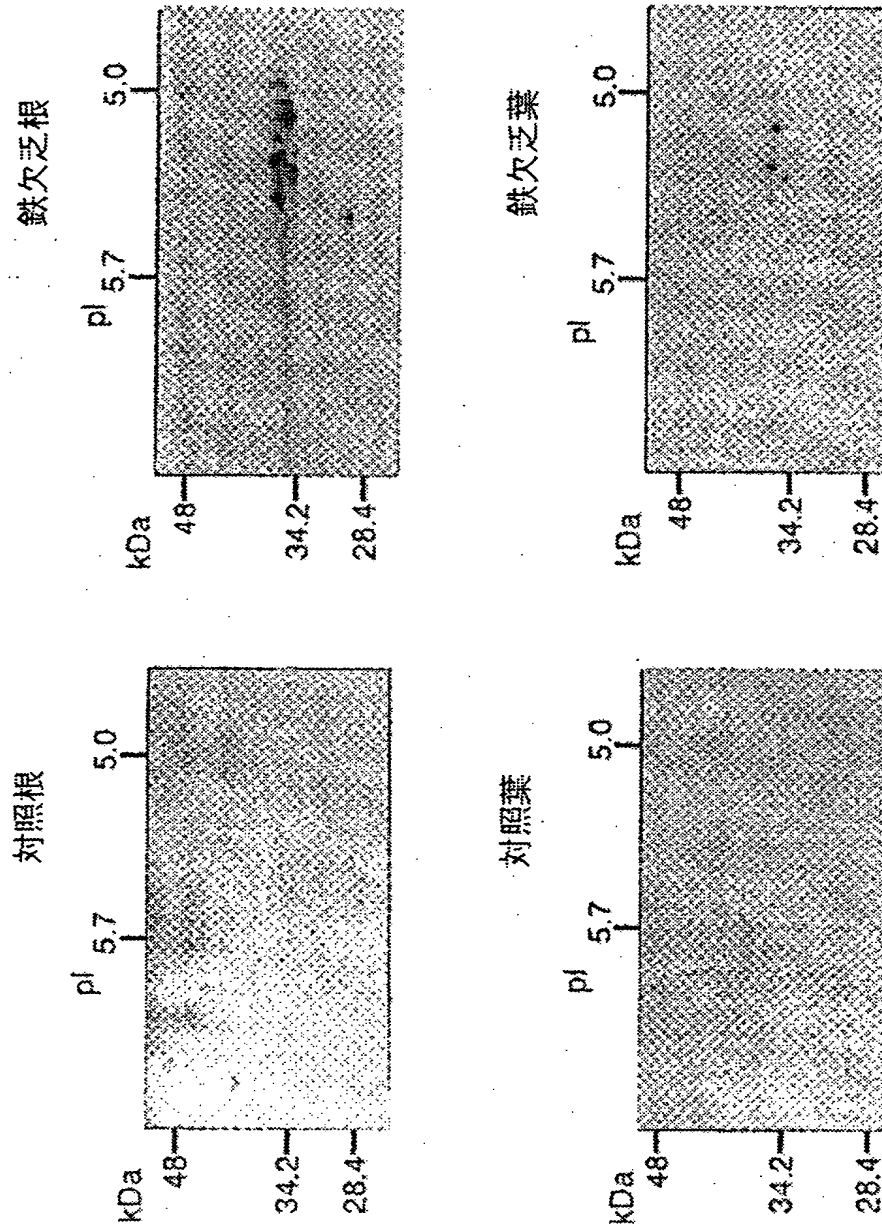
図面代用写真

【図11】



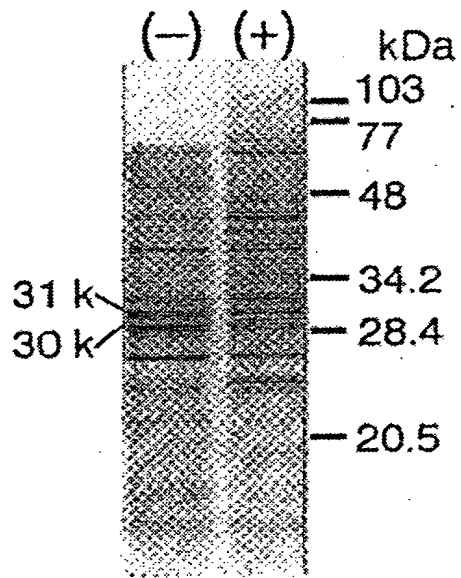
図面代用写真

【图 12】



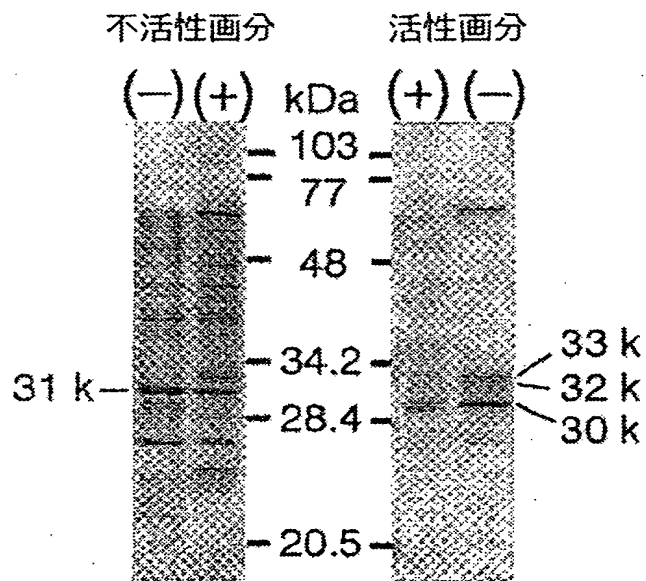
写真用代面図

【図13】



図面代用写真

【図14】



図面代用写真

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 手続補正書

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】

【識別番号】 396020800

【住所又は居所】 埼玉県川口市本町4丁目1番8号

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】 申請人

【識別番号】 100102668

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋3丁目15番2号 高愛ビル9
階 たくみ特許事務所

【氏名又は名称】 佐伯 憲生

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [396020800]

1. 変更年月日	1998年 2月24日
[変更理由]	名称変更
住 所	埼玉県川口市本町4丁目1番8号
氏 名	科学技術振興事業団